Synthese und biologische Effekte von Polyarabinonukleotiden

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Christa Ullrich

aus Görlitz

1969

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543901_0065

Synthese und biologische Effekte von Polyarabinonukleotiden

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Christa Ullrich

aus Görlitz

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:	12.11.1969
Dekan:	Prof. Dr. A. Seilacher
1. Berichterstatter:	Priv.Doz. Dr. A. Anderer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Auterhoff

Dem Andenken von Herrn Professor Dr. G. Schramm gewidmet, welcher das Thema dieser Arbeit vorschlug und mir durch stete Diskussionsbereitschaft und nie versiegenden Optimismus ihre Durchführung ermöglichte.

Herrn Priv.-Doz. Dr. A. Anderer und Herrn Dr. H. Schaller danke ich für weitere Anregungen. Zu besonderem Dank fühle ich mich Frau I. Ulmer-Schürnbrand verpflichtet. Sie leitete meine ersten Schritte auf dem Gebiet der Polynukleotid-synthese an und war mir bei der Durchführung der biologischen Versuche eine wertvolle Hilfe.

I. Einleitung

II. Allgemeiner Teil

1. Übersicht über die Synthese von Polynukleotiden

2. Synthese von Polyspongouridylsäure

3. Versuche zur Synthese von Polyarabinocytidylsäure

4. Bedingungen für die O^2-2'-Cyclisierung von Uridinderivaten

5. Darstellung von O^2-2'-Cyclouridinphosphat

6. Polymerisation von O^2-2'-Cyclouridincyanoäthylphosphat

7. Polymerisation von O^2-2'-Cyclouridinphosphat

8. Biologische Eigenschaften von Polyspongouridylsäure

III. Zusammenfassung und Diskussion

IV. Experimenteller Teil

1. Materialien und allgemeine Methoden

2. Darstellung von Nukleosiden und Nukleotiden

3. Modifikation der Synthese von Polyspongouridylsäure nach G. Schramm und I. Ulmer-Schürnbrand

4. Polymerisation von Cytidylsäure mit Polyphenylphosphorsäureester

5. Polymerisation von O^2-2'-Cyclouridincyanoäthylphosphat

6. Polymerisation von O^2-2'-Cyclouridinphosphat

7. Biologische Versuche

V. Literatur

I. Einleitung

Nach der Entdeckung der Desoxyribonukleinsäure (DNS) im Jahre 1869 durch Friedrich Miescher in Tübingen (1) vergingen fünfundsiebzig Jahre, bevor Avery bewies, daß diese Substanz Träger der Erbeigenschaften ist (2). Der Mechanismus der Entschlüsselung und Übertragung genetischer Information wurde erst in den letzten zehn Jahren aufgeklärt. Die in der DNS gespeicherte Information wird auf Ribonukleinsäure (RNS) transkribiert. Die Botschaft (genetischer Code), die in der Basensequenz der RNS gegeben ist, wird in Protein übersetzt. So werden auch die Enzyme synthetisiert, die die Vermehrung der DNS steuern. Auf diese Weise wird eine identische Reduplikation genetischer Information möglich. R.W. Holley, H.G. Khorana und M.W. Nirenberg wurden im Jahre 1968 für fundamentale Arbeiten bei der Aufklärung dieser Zusammenhänge mit dem Nobelpreis ausgezeichnet.

Die Nukleinsäuren sind aus Nukleotiden, den Phosphatestern der Nukleoside, zusammengesetzt. Die Nukleoside bestehen aus einer Base und einem Zucker. Wie der Name sagt, ist dies Desoxyribose bei Desoxyribonukleinsäure und Ribose, wenn es sich um Ribonukleinsäure handelt. Die Art des Zuckers ist für die Spezifität der Enzyme wesentlich, und eine Abwandlung der Zuckerkomponente verändert die biologische Funktion der Nukleinsäuren. Solche Funktionsänderungen können pharmakologisch bedeutsam sein.

Ihrer pharmakologischen Wirkung wegen sind die Nukleoside der Arabinose von besonderem Interesse. Evans et al. (3) fanden, daß ara-Cytosin (1-ß-D-arabinofuranosyl-cytosin) das Wachstum bestimmter Tumoren bei Mäusen hemmt. Später wurde dieser Hemmeffekt von ara-Cytosin auch bei virusinfizierten Säugetierzellen nachgewiesen. Weitere Untersuchungen ergaben, daß ara-Cytosin die Synthese neuer DNS und damit das Wachstum behindert und dieser Effekt durch Hemmung der Cytidinphosphatreductase verursacht wird (4,5). Das Enzym verwandelt Cytidindiphosphat in Desoxycytidindiphosphat und reguliert damit die DNS-Synthese. Durch Desoxycytidin läßt sich die durch ara-Cytosin erzeugte Hemmung kompensieren (6). Nach neueren Untersuchungen ist die Hemmung der DNS-Polymerase durch ara-Cytosin entscheidender für die Reduzierung der DNS-Synthese als die Verminderung der Reductaseaktivität (7). Wirkungsvoller als ara-Cytosin hemmt ara-Adenin (9-ß-D-arabinofuranosyladenin) das Tumorwachstum und ist dabei weniger toxisch für gesundes Gewebe. Eine Möglichkeit der Anwendung in der Humanmedizin erscheint deshalb hier am aussichtsreichsten.

Die ara-Nukleoside werden von Nukleosidphosphorylasen als Substrate akzeptiert. Da diese Enzyme in allen Geweben verbreitet sind, bilden sie wahrscheinlich aus den ara-Nukleosiden die entsprechenden Nukleotide und vermutlich verursachen diese die geschilderten Effekte. Versuche zur Reductasehemmung mit ara-Adenindiphosphat und ara-Cytosindiphosphat (8), sowie zur DNS-Polymerasehemmung mit ara-Cytosintriphosphat und ara-Adenintriphosphat (9) stützen diese Annahme.

Die ara-Nukleoside Spongouridin und Spongothymidin kommen in dem in der Karibischen See wachsenden Schwamm Cryptothetia crypta vor, aus welchem sie von W. Bergmann und R.J. Feeney (10,11) isoliert wurden. Es wird vermutet, daß die Nukleoside dem Schwamm als Antibioticum dienen. Sie gelangen in die Kanäle, von denen das Ektoderm durchzogen ist und verhindern das Wachstum von Mikroorganismen in der näheren Umgebung des Schwammes.
Aus Uridin bzw. Thymidin lassen sich diese natürlichen Arabinoverbindungen auch synthetisieren. Ebenfalls synthetisch dargestellt wurden ara-Cytosin, ara-Adenin, ara-Guanin und ara-Halogenuracil. Ein natürliches Vorkommen dieser Verbindungen ist nicht bekannt. Ara-Nukleotide wurden durch Phosphorylierung der entsprechenden ara-Nukleoside auf chemischem Wege gewonnen (12).

Polyarabinonukleotide treten heute in der Natur nicht auf, aber es wird angenommen, daß sie in präbiologischen Systemen vorkamen und dort entweder als Matrix (14) oder als Hemmstoff (13) für einfache Lebensvorgänge dienten. Die Stellung der Polyarabinonukleotide zwischen RNS und DNS im chemischen Verhalten legt den Schluß nahe, daß sie möglicherweise der Ausgangspunkt für die Evolution beider Nukleinsäuretypen waren.

Die Synthese von Polyarabinonukleotiden ist unter dem Gesichtspunkt einer möglichen therapeutischen Anwendung ebenso interessant, wie für die Untersuchung, welchen Einfluß die Art des Zuckers auf die Struktur und Funktion von Polynukleotiden nimmt. Auf dem Gebiet der Polyarabinonukleotide hat G. Schramm gearbeitet und neue Aspekte gesetzt.

Die Nachprüfung der von G. Schramm, I. Ulmer-Schürnbrand (14) gefundenen Ergebnisse bei der Synthese von Polyarabinouridylsäure, eine eventuelle Verbesserung der Herstellungsvorschrift, der Konstitutionsbeweis der erhaltenen Produkte durch Vergleich mit auf anderem Wege synthetisierter Polyarabinouridylsäure, sowie die Untersuchung biologischer Effekte waren die Ziele vorliegender Arbeit.

II. Allgemeiner Teil

1. Übersicht über die Synthese von Polynukleotiden

Eine Synthese von biologisch aktiven Desoxyribo- und Ribonukleinsäuren ist nur auf enzymatischem Wege möglich (15). Mit chemischen Methoden gelang bisher nur die Verknüpfung einer begrenzten Anzahl von Nukleotiden, doch sind auch diese kurzen Ketten für die Klärung bestimmter biologischer Probleme nützlich.

Die chemische Synthese von Nukleotidhomopolymeren ist in der D e s o x y r i b o nukleotidreihe relativ einfach. Umsetzung der entsprechenden 3'-Nukleotide mit Kondensationsmitteln liefert gute Ausbeuten. Das längste bisher gewonnene Polynukleotid ist Polythymidylsäure mit einer Kette aus 30 Nukleotiden (16). Will man R i b o nukleotide auf diese Weise polymerisieren, so muß die 2'-OH-Gruppe geschützt werden. Dazu wird der Acetyl- oder Tetrahydropyranylrest benutzt (17). Schwierigkeiten treten dann bei der zur Abspaltung der Schutzgruppen nötigen alkalischen bzw. sauren Hydrolyse auf. Im ersten Fall ist eine teilweise Spaltung der Phosphodiesterbindung möglich, bei saurer Hydrolyse kann partiell eine Isomerisierung der 3'-5'- in eine 2'-5'-Bindung eintreten. In den natürlichen Nukleinsäuren treten ausschließlich 3'-5'-Phosphodiesterbindungen auf.

Eine Synthese definierter Nukleotidsequenzen ist nur durch eine stufenweise Polymerisation möglich, indem ein Nukleotid nach dem anderen der wachsenden Kette angefügt wird. Dabei müssen alle Hydroxylgruppen geschützt werden, die nicht reagieren sollen.

Das Auffinden geeigneter Schutzgruppen, die sich leicht wieder entfernen lassen, ist dabei sehr problematisch. Außerdem muß nach jedem Reaktionsschritt eine saubere Trennung erfolgen, wozu man sich der Säulenchromatographie bedient, die sehr zeitraubend ist. Eine Verbesserung bringt hier die Polymerisation an einem festen Träger. Die wachsende Kette wird an ein Polystyrolharz geknüpft und nicht umgesetztes Nukleotid läßt sich nach jeder Reaktionsstufe durch Waschprozesse entfernen (18).

Eine weitere Möglichkeit zur Synthese von Polynukleotiden definierter Sequenz stellt die Blockpolymerisation dar. Man verbindet dabei vorgefertigte Oligonukleotide zu größeren Einheiten. Diese Methode wird gegenwärtig von H.G. Khorana et al. zur Synthese von Alanin-Transfer-RNS verwendet.

Als Kondensationsmittel der Polynukleotidpolymerisation werden vorwiegend Phenylphosphorsäurechloridate, Carbodiimide und Sulfonsäurechloride verwendet. Triisopropylbenzolsulfochlorid wird zur Zeit am häufigsten gebraucht (18,19,20). Aus sterischen Gründen wird dabei die Bildung cyclischer 3'-5'-Phosphate erschwert und eine Sulfonierung freier Hydroxylgruppen vermieden, wodurch die Polymerisationsausbeuten steigen.

Im Prinzip sind die für die Polynukleotiddarstellung benutzten Verfahren auch auf Arabinonukleotide anwendbar. Wegen der Schwierigkeit des selektiven Schutzes der 2'-OH-Gruppe von Arabinonukleotiden geht jedoch keine der für Polyarabinonukleotide bekannten Synthesen vom Arabinomononukleotid aus. Die erste Synthese von Polyarabinouridylsäure aus Uridylsäure und

Polyphenylphosphorsäureestern (PPE) wurde von G. Schramm und I. Ulmer-Schürnbrand beschrieben (14). Umwandlung des eingesetzten Nukleotids in ein 2'-3'-cyclisches Phosphat, Bildung von O^2-2'-Cyclouridin-3'-phosphat und Polymerisation desselben sind die postulierten Reaktionsschritte (Abb. 1). Bei der wei-

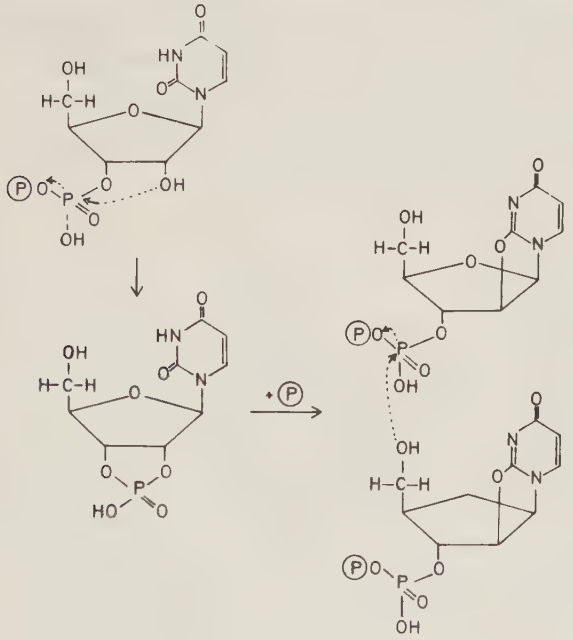


Abb. 1: Kondensation von Uridylsäure mit PPE

teren Aufarbeitung erfolgt die Umwandlung der Polycyclouridylsäure in Polyarabinouridylsäure, welche die Autoren als Polys p o n g o uridylsäure bezeichnen. Zwei weitere Möglichkeiten, Polyarabinouridylsäure darzustellen, fand J. Nagyvary. Die eine

verwendet Polyuridylsäure als Ausgangsstoff (21,22). Sie schließt die Formation eines 2'-3'-5'-Cyclophosphates aus den vorliegenden 3'-5'-Phosphorsäurediesterbindungen ein. Beim Erhitzen tritt eine basenkatalysierte Verschiebung zu O^2-2'-Cyclouridinderivaten ein. Durch milde alkalische Hydrolyse ist die Umwandlung in Oligoarabinuridylsäure möglich. Es tritt eine Kettenverkürzung ein und das am 3'-Ende stehende Nukleotid hat Ribokonfiguration (Abb. 2). Der zweite Weg geht von O^2-5'-Cyclouridin-2'-3'-cyclophosphat aus (23). Beim Erhitzen in Gegenwart tertiärer Basen entsteht Polyarabinouridylsäure unterschiedlicher Kettenlänge (Abb. 3).

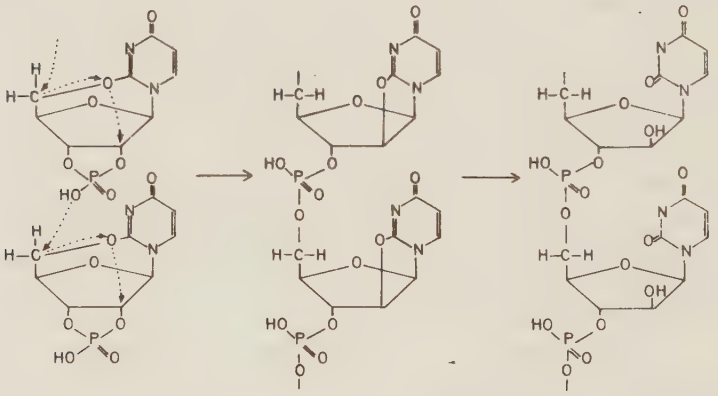


Abb. 3: Darstellung von Polyarabinouridylsäure aus O^2-5'-Cyclouridin-2'-3'-cyclophosphat

Von diesen drei bekannten Möglichkeiten der Darstellung von Polyarabinouridylsäure sollte die Methode von G. Schramm, I. Ulmer-Schürnbrand in der vorliegenden Arbeit eingehender untersucht werden.

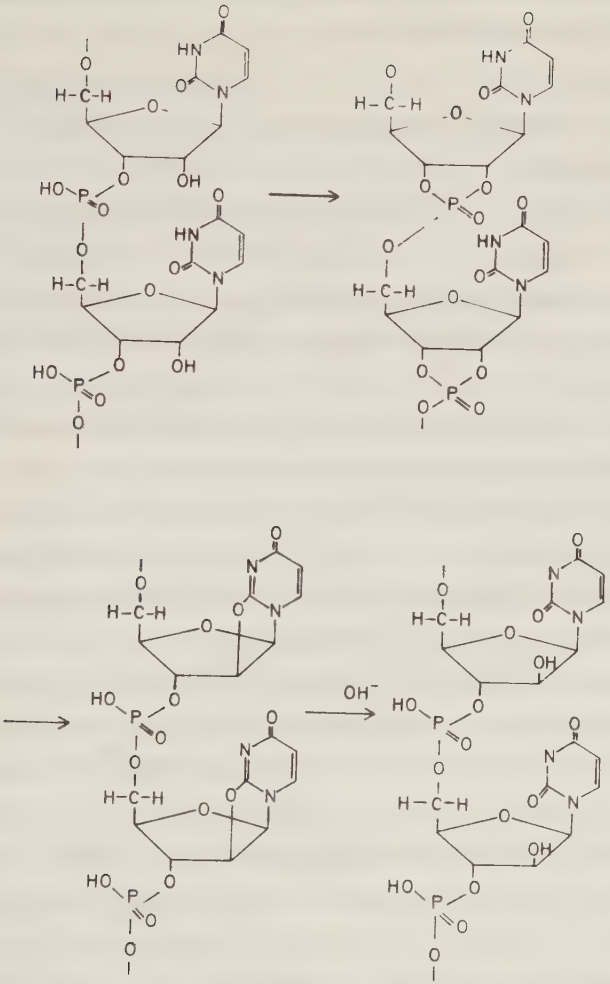


Abb. 2: Darstellung von Polyarabinouridylsäure aus Polyuridylsäure

2. Synthese von Polyspongouridylsäure nach G. Schramm und I. Ulmer-Schürnbrand (14)

Die Synthese von G. Schramm, I. Ulmer-Schürnbrand geht von Dinatrium-2'-(3')-Uridylphosphorsäure aus, die mit Polyphenylphosphorsäureester auf 100°C erhitzt wird. Dabei tritt sowohl eine Kondensation als auch eine teilweise Phosphorylierung freier OH-Gruppen des Mononukleotids ein. Die phosphorylierten Produkte lassen sich, da sie Phenylreste enthalten, ebenso wie Polyphenylphosphorsäureester durch Ausschüttelung mit Butanol weitgehend entfernen. Es bleibt ein weißes Sediment zurück, dessen UV-Spektrum gegenüber dem der Uridylsäure verschoben ist. Die Verschiebung des Extinktionsmaximums von 262 nm zu 250 nm entspricht dem Auftreten einer Ätherbrücke zwischen dem C-2 der Base und dem C'-2 des Zuckers. Durch nachfolgende Hydrolyse mit Salzsäure wird diese Ätherbrücke gespalten, das Spektrum zeigt wieder sein Maximum bei 262 nm. Nach Polymerisation und Hydrolyse ist aber eine Inversion der 2'-OH-Gruppe des Zuckers erfolgt. Statt der ursprünglichen cis-Konfiguration im eingesetzten Ribonukleotid steht die 2'-OH-Gruppe jetzt in trans-Stellung. Es liegt Poly a r a b i n o uridylsäure vor. Die Hydrolysenbedingungen sind so gewählt, daß Poly r i b o uridylsäure dabei vollständig in Mononukleotide gespalten wird und nur die stabile Polyspongouridylsäure (= Polyarabinouridylsäure) zurückbleibt. Nach Neutralisation der sauren Lösung und Dialyse werden die synthetisierten Produkte an einer DEAE-Cellulose-Säule chromatographiert. Die

maximalen Ausbeuten an Polymerisat mit einer Kettenlänge n>5 betrugen 1%. Für den Reaktionsablauf wird der in Abb. 1 gegebene Mechanismus postuliert. Ein Vorteil der Methode ist die leichte Zugänglichkeit der Ausgangsprodukte. Dadurch können Mengen eingesetzt werden, welche trotz der geringen Ausbeuten die Gewinnung von Polyspongouridylsäure höherer Kettenlängen in größerem Ausmaß ermöglichen.

Bei der Nachprüfung dieser Darstellungsmethode traten Schwierigkeiten bei der Reproduktion der Ergebnisse auf. Die Polymerisationsausbeuten und die Kettenlängen der synthetisierten Produkte schwankten. Zahlreiche Versuche konzentrierten sich zunächst auf eine Standardisierung der Synthesevorschrift. Der Einfluß des verwendeten PPE auf die Kondensation, sowie die Zeit- und Temperaturabhängigkeit der Reaktion mußten dafür untersucht werden. Um die Ausbeute an Polyspongouridylsäure zu vergrößern, sollten Verluste bei der Aufarbeitung verringert werden. Zudem enthielt das Endprodukt von Schramm/Ulmer überschüssiges Phosphat. Die Identifikation einzelner Verbindungen des Polymerisats fehlte noch.

Bei der sorgfältigen Herstellung von Polyphenylphosphorsäureester unter wasserfreien Bedingungen wurde ein Produkt erhalten, das trotz sehr guter Phosphorylierungseigenschaften bei der Kondensation sehr schlechte Ausbeuten gab. Empirisch wurde gefunden, daß ein gewisser Wassergehalt des PPE für die Kondensation wichtig ist, d.h. wahrscheinlich eine katalytische Funktion übernimmt. Bleibt das PPE mindestens sechs Stunden offen an der Luft stehen, wobei Luftfeuchtigkeit absorbiert wird, so

werden mit diesem Produkt die besten Polymerisationsausbeuten erzielt. Eine Verlängerung der Einwirkung von Luftfeuchtigkeit bringt keine Verbesserung mehr. Es wurde versucht, diesen Feuchtigkeitseffekt durch Zusatz definierter Wassermengen zum PPE zu erreichen. Aber das zugesetzte Wasser verteilt sich in dem viskosen PPE nicht gleichmäßig und deshalb sind die Polymerisationsergebnisse auch hier unbefriedigend. Eine bessere Verteilung ist zu erreichen, wenn das PPE vor der Wasserzugabe in Dimethylformamid gelöst wird, aber die vollständige Entfernung des Lösungsmittels gelingt nicht. Enthält der Kondensationsansatz jedoch Lösungsmittel, dann löst sich das Nukleotid zwar schneller als in PPE allein, aber als Nachteil tritt eine Verringerung der Kettenlängen der synthetisierten Produkte ein.

Die Löslichkeit des Nukleotids im PPE ist für das Ausmaß der Polymerisation wesentlich. Optimale Bedingungen liegen vor, wenn der Reaktionsansatz 24 Stunden bei 100°C behandelt wird. Es wurden Versuche bei 60°C und 80°C ausgeführt. Die Ausbeuten lagen unter den bei 100°C erhaltenen Werten. Wenn man die Zeitdauer der Polymerisation verlängert, dann lassen sich die Ausbeuten auch bei 80°C auf den Durchschnittswert bei 100°C steigern. Eine Verlängerung der Reaktionszeit bei 100°C vergrößert die Ausbeute nicht mehr.

Ferner hat sich herausgestellt, daß bei der von Schramm/Ulmer durchgeführten Dialyse der Polyspongouridylsäure zur Entfernung von Salzen nicht nur Mononukleotide und Salz, sondern auch Oligonukleotide in das Außendialysat diffundieren, wie durch chromatographische Prüfung desselben nachgewiesen wurde.

Wurde die saure Hydrolyse mit Perchlorsäure durchgeführt und diese nach Einengen der Reaktionslösung mit Kalilauge als schwerlösliches Kaliumperchlorat gefällt und abfiltriert, so konnte das Filtrat, das die Polyspongouridylsäure enthielt, an DEAE-Cellulose oder Sephadex chromatographiert werden. Die Salzkonzentration in der verbliebenen Lösung war so gering, daß sie bei der Chromatographie nicht störte. Damit konnte auf die Dialyse verzichtet werden und ein Verlust an Oligonukleotiden wurde vermieden.

Die mit Polyphenylphosphorsäureester synthetisierten Produkte enthalten zwischen 10-30% mehr Phosphat als dem theoretischen Wert entspricht. Es wurde versucht, durch eine Essigsäureanhydridbehandlung nach H.G. Khorana et al. (24) diesen Wert zu reduzieren. Beim Vorliegen von Pyrophosphatbindungen bildet sich mit Essigsäureanhydrid ein gemischtes Phosphorsäure-Essigsäureanhydrid, welches durch Wasser leicht gespalten wird. Es wären dann Brüche in der Polynukleotidkette an den Stellen zu erwarten, wo sich Pyrophosphatbindungen befinden. Die Elutionsdiagramme an Sephadex G-75 waren vor und nach Essigsäureanhydridbehandlung identisch und die Phosphatwerte nicht vermindert. Somit kann ausgeschlossen werden, daß das Überschußphosphat in Pyrophosphatbindungen enthalten ist. Wahrscheinlich liegen unspezifische Phosphorylierungen an der Base vor, die sich kaum rückgängig machen lassen.

Die Kettenlängen der gewonnenen Produkte wurden nach Th. Hohn und H. Schaller (25) mit dem Molekularsiebverfahren an einer Sephadex G-75-Säule bestimmt. Um nun einzelne Nukleotide zu

identifizieren, wurden die Polykondensationsprodukte an einer DEAE-Cellulose-Säule chromatographiert. Die einzelnen Gipfel wurden papierchromatographisch im System Ammoniumacetat/ Äthanol nachgetrennt und die Hauptbanden durch chromatographischen Vergleich mit den entsprechenden Oligoribonukleotiden bestimmt. Die verwendeten Oligoribonukleotide wurden durch enzymatischen Abbau von Polyuridylsäure mit Micrococcal-Nuclease und Auftrennung an einer DEAE-Cellulose-Säule hergestellt (26). Um auszuschließen, daß endständige Phosphatgruppen die Laufgeschwindigkeit der Nukleotide mindern und dadurch längere Kettenlängen vorgetäuscht werden, wurden die Oligonukleotide nach Phosphatasebehandlung mit den gleichfalls von endständigem Phosphat befreiten Vergleichssubstanzen chromatographiert. Zur weiteren Identifizierung wurden Phosphatbestimmungen durchgeführt.

Die Abb. 4 zeigt das DEAE-Cellulose-Elutionsdiagramm von Polyspongouridylsäure. Die Fraktionen 34-40 (Peak I) des DEAE-

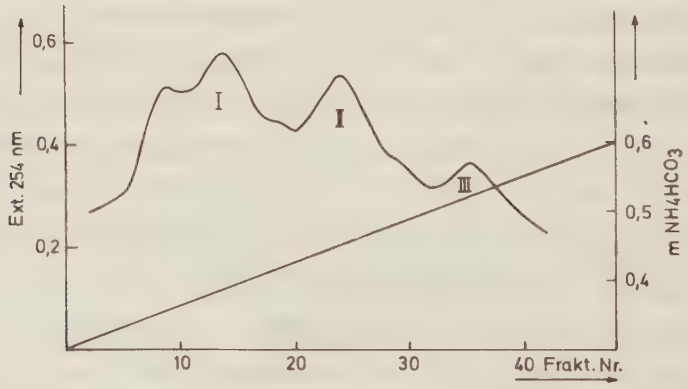


Abb. 4: DEAE-Cellulose-Elutionsdiagramm von Polyspongouridylsäure

Celluloselaufs enthalten in der Hauptsache $(ara\text{-}Up)_4$, Fraktionen 43-49 (Peak II) enthalten $p(ara\text{-}Up)_4$ und Fraktionen 55-63 (Peak III) enthalten $p(ara\text{-}Up)_5$.

Als Ergebnis der vorliegenden Versuche wurde eine Standardisierung der Polymerisationsausbeuten auf 1% erreicht. Das Überschußphosphat konnte nur unwesentlich reduziert werden. Deshalb war die Erarbeitung eines anderen Syntheseweges nötig, um reine Polyspongouridylsäure zu erhalten.

3. Versuche zur Synthese von Polyarabinocytidylsäure

Sowohl E.R. Walwick et al. (27) als auch A.R. Todd et al. (28) diskutieren in ihren Arbeiten, daß ihre Methoden der Darstellung von O^2-2'-Cyclonukleosid bzw. -nukleotid für beide Pyrimidinribonukleoside anwendbar sind. Es war daher von besonderem Interesse, die Kondensation von Cytidylsäure mit PPE mit der Methode Schramm/Ulmer (14) zu untersuchen.

Bei dieser Reaktion fiel zunächst auf, daß das Natriumsalz der Cytidylsäure, wie auch die freie Säure selbst, sich nicht gänzlich in PPE lösten. Es wurde deshalb das Triäthylaminsalz der Cytidylsäure hergestellt und dieses unter Zusatz von Triäthylamin drei Tage lang bei $60^{\circ}C$ mit PPE kondensiert. Mit Butanol konnte der helle Sirup gelöst werden, wobei ein Teil des eingesetzten Nukleotidmaterials ausfiel. Zur Spaltung von Phosphoramidaten wurde alkalisch, dann zur Eliminierung von Pyrophosphatbindungen und Polyphenylphosphaten sauer hydrolysiert. Fraktionierung des Produkts an einer Sephadex G-75-Säule ergab Kettenlängen bis n=10 (Abb. 5). Nach der Polymeri-

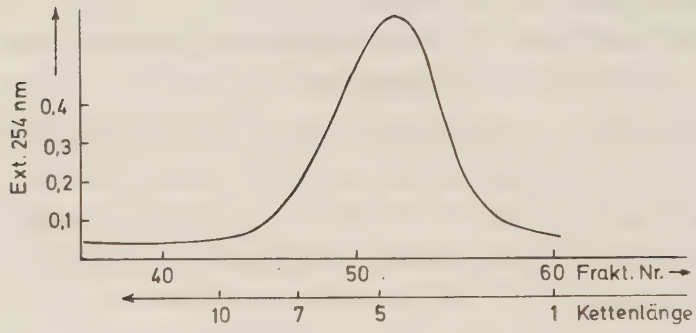


Abb. 5: Sephadex G-75-Elutionsdiagramm von Polyarabinocytidylsäure

sation war eine Verschiebung des Extinktionsmaximums der Cytidylsäure zu kürzeren Wellenlängen zu beobachten, wie sie bei Bildung einer O^2-2'-Cyclocytidinverbindung zu erwarten wäre. O^2-2'-Cyclocytidin hat ein Extinktionsmaximum bei 262 nm (pH = 1-7). Nach alkalischer Hydrolyse trat das theoretische Maximum der Cytidylsäure von 280 nm (pH = 2) nicht mehr auf. Das Maximum lag jetzt bei 277 nm. Bei der sauren Hydrolyse verschob es sich noch weiter zu kürzeren Wellenlängen. Das molare Verhältnis der Cytidylsäure-Extinktion : Phosphat betrug 1 : 3 nach alkalischer und zwischen 1 : 2 und 1 : 2,5 nach saurer Hydrolyse und war durch Essigsäureanhydridbehandlung zur Spaltung von Pyrophosphaten (24) nicht zu reduzieren. Mit Phosphatase wurden nie mehr als 20% Phosphat abgespalten.

Mit Snake venom Enzym und Phosphatase gelang es, ca. ein Drittel des Polymerisats bis zum Nukleosid abzubauen. Elektrophorese zeigte, daß sowohl Arabinosid als auch Ribosid vorhanden waren.

Über eine Dowex OH^--Säule erfolgte die Trennung. Während das Spektrum des Ribosids sein Extinktionsmaximum erwartungsgemäß bei 280 nm (pH = 2) hatte, trat das Extinktionsmaximum des Arabinosids bei 270 nm auf (Abb. 6). Es lag ein Gemisch

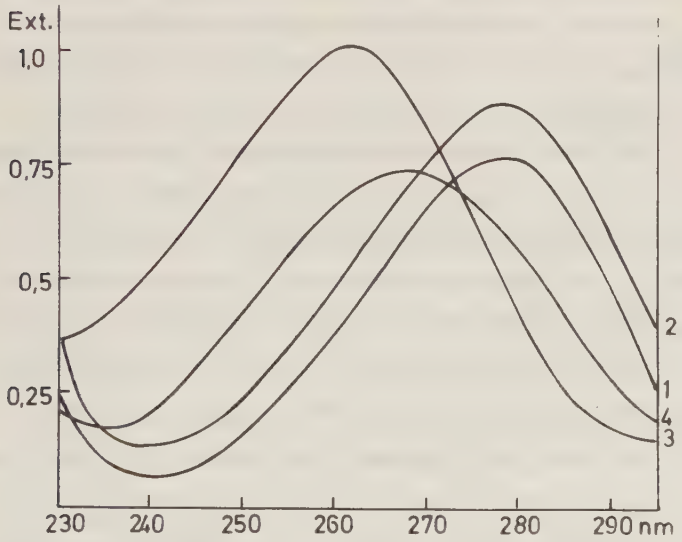


Abb. 6: UV-Spektra von ara-Cytosin (1), Cytidin (2), ara-Uracil (3), ara-Cytosin + ara-Uracil (4)

von ara-Uracil und ara-Cytosin (55% : 45%) vor, welches papierchromatographisch getrennt wurde. Damit erklärt sich die spektrale Verschiebung, die nach der Polymerisation und der Hydrolyse regelmäßig beobachtet wurde aus dem Vorliegen eines Gemisches von Uracil- und Cytosinnukleotid infolge teilweiser Desaminierung der eingesetzten Cytidylsäure. Über diesen Des-

aminierungsmechanismus kann vorläufig nichts Eindeutiges ausgesagt werden.

Eine Acetylierung der NH_2-Gruppe sollte eine Desaminierung während der Polymerisation vermeiden. N-Acetylcytidin-2'-3'-cyclophosphat-Tributylaminsalz wurde mit PPE kondensiert und in der üblichen Weise aufgearbeitet. Das Extinktionsmaximum bei 302 nm für N-Acetylcytidinphosphat war im Polymerisat zu 283 nm verschoben, während das Maximum bei 244 nm erhalten blieb. Nach kurzer alkalischer Hydrolyse war wieder ein Maximum bei 302 nm zu erkennen, nach 2 Stunden wurde ein sauberes Cytidylsäurespektrum mit dem Maximum bei 280 nm (pH = 2) erhalten. Die Spaltung der entstandenen O^2-2'-Cyclocytidinverbindung ging offenbar schneller als die Abspaltung der Acetylgruppe vonstatten. Nach alkalischer und saurer Hydrolyse war das Spektrum wieder zu kürzeren Wellenlängen verschoben.

Obwohl die Acetylgruppe während der Polymerisation stabil geblieben war, waren die Kondensationsprodukte mit Snake venom Enzym und Phosphatase nur zu 30% zum Nukleosid abbaubar und das molare Verhältnis der Cytidylsäure-Extinktion : Phosphat betrug 1 : 2,5. Danach erscheint es unwahrscheinlich, daß das überschüssige Phosphat in Form eines Phosphoramidats an der NH_2-Gruppe gebunden ist.

4. Bedingungen für die O^2-2'-Cyclisierung von Uridinderivaten

Auf der Suche nach anderen Möglichkeiten für die Herstellung von Polyspongouridylsäure erschien es zunächst wünschenswert, die Bedingungen eingehend zu untersuchen, unter welchen eine

Zwischenstufe der Schramm/Ulmer-Synthese, nämlich die O^2-2'-Cyclisierung, in höherer Ausbeute vonstatten geht. Diese Cyclisierung bedeutet eine Blockierung der 2'-OH-Gruppe des Zuckers für weitere Reaktionen mit der Konsequenz, daß bei einer Polymerisation vorzugsweise 3'-5'-Phosphorsäurediesterbindungen entstehen müssen. Der Schutz der 2'-OH-Gruppe ist unbedingt nötig, die Einführung einer Schutzgruppe und die selektive Abspaltung derselben aber sind schwierig. Die O^2-2'-Cyclisierung ist jedoch die eleganteste Variation einer Schutzgruppe und sollte deshalb auch für eine neue Synthese verwendet werden. Es war zu erwarten, daß bei Verwendung von O^2-2'-Cyclouridinphosphat als Ausgangsprodukt, die Polymerisation und Hydrolyse zum Arabinoderivat als Teilschritte übersichtlicher und in besserer Ausbeute verlaufen würden.

Bei der Polymerisation von Uridylphosphat entsteht auch O^2-2'-Cyclouridinphosphat (s. Abschnitt II/2), welches schon bei der Aufarbeitung zum Teil in Arabinouridylphosphat umgewandelt wird. Die Ausbeute an O^2-2'-Cyclouridinphosphat sollte zu vergrößern sein, wenn man die 5'-OH-Gruppe in der Uridylsäure acetyliert und damit eine Polymerisation verhindert. Die Behandlung von 5'-Acetyluridin-2'-3'-cyclophosphat mit PPE bei 60°C fünf Stunden lang lieferte die O^2-2'-Ätherbrücke, wie das UV-Spektrum zeigte (Abb. 7), aber weder gelang es, unter gänzlicher Vermeidung der Verwandlung von O^2-2'-Cyclouridinphosphat zu Arabinouridinphosphat die Acetylgruppe abzuspalten, noch war es möglich, das entstandene O^2-2'-Cyclouridinphosphat von gleichzeitig gebildetem Arabinouridylphosphat, nicht umge-

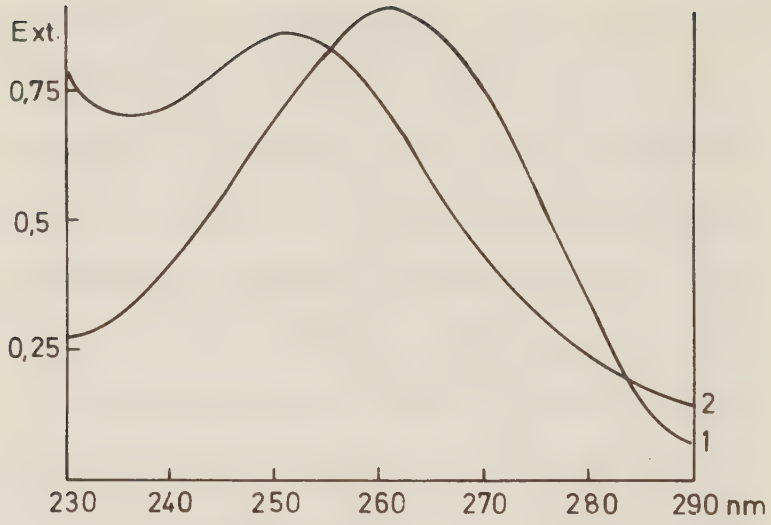


Abb. 7: UV-Spektra von 5'-Acetyluridin-2'-3'-cyclophosphat (1) und 5'-Acetyl-O^2-2'-cyclouridin-3'-phosphat (2)

setztem Ausgangsprodukt, 5'-Acetyluridinphosphat, sowie dem PPE sauber abzutrennen.
Wegen dieser Schwierigkeiten der Auftrennung der Reaktionsprodukte ist diese Methode zur Gewinnung von O^2-2'-Cyclouridinphosphat nicht zu verwenden.

Die Chance einer sauberen Abtrennung des überschüssigen PPE nach der Reaktion sollte durch Verminderung der PPE-Menge zu vergrößern sein. Um das Nukleotid trotz der verringerten PPE-Menge in Lösung zu bringen, war der Zusatz von Tributylamin oder Lösungsmittel nötig. Wurde jedoch mehr als die dem Nu-

kleotid äquivalente Menge Tributylamin dem Reaktionsgemisch zugesetzt, um bei wenig PPE trotzdem eine vollständige Lösung zu erhalten, so erfolgte keine O^2-2'-Cyclobildung mehr. Bei Verwendung äquivalenter Tributylaminmengen unter Zusatz unterschiedlicher Mengen von Phosphorsäuretrisdimethylamid oder Dimethylformamid unterblieb die O^2-2'-Cyclobildung ebenfalls.

Nach diesen Versuchen war klar, daß O^2-2'-Clouridinphosphat durch Umsetzung des geschützten Ribonukleotids mit PPE präparativ nicht darstellbar ist.

Es wurde deshalb versucht, das PPE durch Diphenylphosphochloridat zu ersetzen, da dieses ähnliche kondensierende Eigenschaften besitzt. Die bei der Hydrolyse entstehende Diphenylphosphorsäure ist in organischen Lösungsmitteln gut löslich und daher leicht abzutrennen. Bei Behandlung von 5'-Acetyluridin-2'-3'-cyclophosphat mit Diphenylphosphochloridat bei Raumtemperatur bildet sich die O^2-2'-Ätherbrücke nicht. Das Nukleotidspektrum war nach Entfernung des Diphenylphosphochloridats durch Ausschüttelung mit Chloroform unverändert. Nach Abbau des aus dem Reaktionsgemisch isolierten Nukleotids mit Phosphatase zum Nukleosid war ein schwacher zur Kathode laufender Fleck im Papierelektrophoresechromatogramm sichtbar. Da als Laufmittel eine gesättigte Boratlösung verwendet wurde, kann geschlossen werden, daß die 2'- und 3'-OH-Gruppe des Zuckers in trans-Stellung stehen, wie das beim Spongouridin der Fall ist. Mit cis-ständigen OH-Gruppen bildet das Borat einen Komplex, welcher infolge negativer Ladung zur Anode wandert, während ein Nukleosid mit trans-ständigen Hydroxylgruppen am Start liegen bleibt oder vom

Ionenstrom geringfügig in Richtung der Kathode bewegt wird (29). Die geringe Menge Spongouridin, die bei Umsetzung des geschützten Ribonukleotids mit Diphenylphosphochloridat entsteht, läßt vermuten, daß zumindest intermediär eine O^2-2'-Cyclisierung eintritt. Die Ätherbrücke wird aber sofort gespalten, was möglicherweise an den extrem sauren Bedingungen liegt.

Syntheseversuche im alkalischen Milieu wurden nach der Vorschrift von A.M. Michelson (30) zur Polymerisation von Uridylsäure mit Diphenylphosphochloridat mit einem Überschuß von Tributylamin durchgeführt. Das Polymerisat wurde aufgearbeitet und der mit Snake venom Enzym und Phosphatase abbaubare Anteil auf ara-Uracil untersucht, da die Hoffnung bestand, hier ein stärkeres Ausmaß der sterischen Umkehrung der 2'-OH-Gruppe zu beobachten als unter sauren Bedingungen. Es wurde kein Spongouridin identifiziert. Die Bildung der O^2-2'-Cyclobindung, welche die Voraussetzung für eine Inversion bildet, findet also nur im sauren Medium und bei höherer Temperatur statt. Diphenylphosphochloridat mit und ohne Tributylamin läßt sich zu diesem Zweck nicht verwenden. Wenn die Suspension aus Nukleotid und Diphenylphosphochloridat höheren Temperaturen ausgesetzt wurde, färbte sie sich dunkel, was auf eine Spaltung der Nukleosidbindung und Zersetzung der Zuckerkomponente schließen läßt.

Die Wichtigkeit von pH und Temperatur für die Cyclisierung bestätigen auch die Versuche von E.R. Walwick, W.K. Roberts und C.A. Decker (27), welche bei der Phosphorylierung von Pyrimidinribonukleosiden mit Polyphosphorsäure bei erhöhter Temperatur O^2-2'-Cyclonukleotide fanden. Sie nehmen an, daß die Verschiebung einer zunächst an C'-2 des Zuckers befindlichen Pyro-

oder Polyphosphatgruppe stattfindet, wenn die Bindung bei der verhältnismäßig hohen Temperatur (60-90°C) gelockert wird und auf diese Weise der nukleophile Angriff der am C-2 der Base befindlichen OH-Gruppe möglich wird. Wie eigene Versuche ergaben, sind die bei dieser Methode erhältlichen Ausbeuten an O^2-2'-Cyclouridinphosphat sehr gering (< 1%), so daß eine präparative Gewinnung auf diesem Wege zu aufwendig ist.

Zur Gewinnung der O^2-2'-Cycloverbindung wurde schließlich die Methode von D.M. Brown, A.R. Todd und S. Varadarajan verwendet (28). Hierbei wird in die C'-2-Position von Uridin zunächst der Tosylrest eingeführt. Die O^2-2'-Cyclisierung ist danach unter milden alkalischen Bedingungen möglich.
Nach der Untersuchung der Bedingungen für die Bildung von O^2-2'-Cyclouridin und nach Vergleich verschiedener Methoden hat sich gezeigt, daß die Vorschrift von D.M. Brown et al. die besten Ausbeuten liefert (ca. 5%).

5. Darstellung von O^2-2'-Cyclouridinphosphat

A.R. Todd et al. (28) beschreiben die Darstellung von O^2-2'-Cyclouridin durch Hydrolyse von 5'-Acetyluridin-2'-toluolsulfonat. Wenn man diese Hydrolyse auf Nukleotidbasis überträgt, so sollte aus 5'-Acetyluridin-2'-tosyl-3'-phosphat das O^2-2'-Cyclouridinphosphat entstehen. Die Darstellung von 5'-Acetyluridin-2'-tosyl-3'-phosphat wurde aus 5'-Acetyluridin-3'-phosphat mit Toluolsulfochlorid versucht. Dabei entstand 5'-Acetyluridin-2'-3'-cyclophosphat. Zunächst bildet sich wahrscheinlich das gemischte Phosphorsäure-Toluolsulfonsäure-Anhydrid und da der Tosylrest das stärkere Anion darstellt (Todd'sche Regel), erfolgt der nukleophile Angriff des 2'-Hydroxyl am positivierten Phosphat.

Unter Eliminierung des Tosylrestes entsteht 5'-Acetyluridin-2'-3'-cyclophosphat (Abb. 8).

Eine Behandlung von 5'-Acetyluridin-2'-3'-cyclophosphat mit weiterem Toluolsulfochlorid brachte keine zusätzliche Veränderung am Molekül.

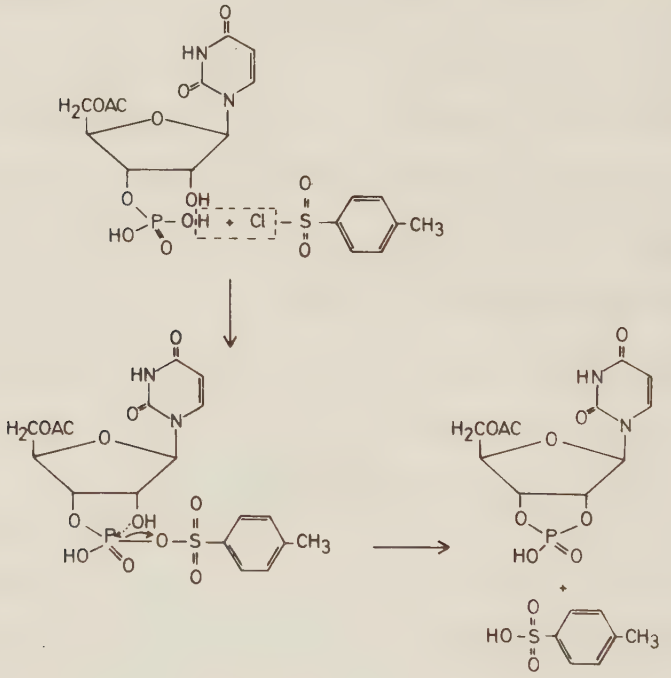


Abb. 8: Umsetzung von 5'-Acetyluridin-3'-phosphat mit Toluolsulfochlorid

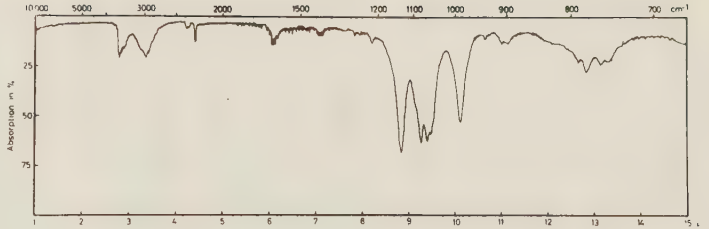
Da die Einführung der Tosylgruppe in das Nukleotid nicht möglich war, wurde 5'-Acetyluridin-2'-toluolsulfonat nach der von Todd et al. (28) gegebenen Vorschrift hergestellt. Statt des

Isopropylidenrestes wurde zum Schutze von 2'- und 3'-OH-Gruppe der Anisylidenrest verwendet (31), da eine spätere hydrolytische Abspaltung leichter erfolgt. Die Phosphorylierung des Produktes wurde auf verschiedenen Wegen versucht:

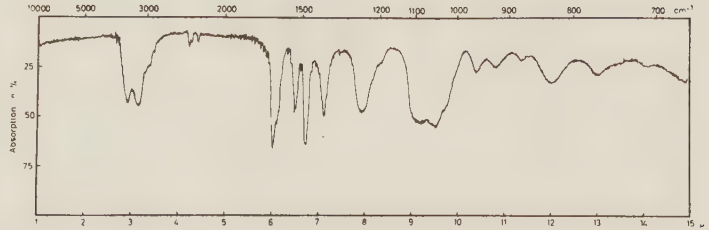
a) Phosphorylierung mit Cyanoäthylphosphat und Dicyclohexylcarbodiimid

Die Phosphorylierung von Nukleosiden mit Cyanoäthylphosphat und Dicyclohexylcarbodiimid wurde von G.M. Tener (32) beschrieben. Bei Anwendung der Vorschrift auf Acetyluridintoluolsulfonat wurde eine Ausbeute von 60-70% Nukleotid erzielt. Die zur Abspaltung des Toluolsulfonsäurerestes unter gleichzeitiger Bildung von O^2-2'-Cycloverbindung verwendeten Hydrolysenbedingungen reichten jedoch nicht aus, um den Cyanoäthylester zu spalten. Nach Hydrolyse in halbkonzentriertem methanolischem Ammoniak und Trennung der Reaktionsprodukte an einer DEAE-Cellulose-Säule durch Gradientenelution wurde O^2-2'-Cyclouridincyanoäthylphosphat in einer Ausbeute von 25% (bezogen auf die eingesetzte Nukleosidmenge) erhalten. Mit Phosphatase war der Phosphatrest nicht abspaltbar. Der Versuch, den Diester mit Spleendiesterase zu spalten, mißlang, obwohl beschrieben ist, daß der p-Nitrophenylester des Thymidinphosphates gespalten wird (33) und dieser Test mit dem verwendeten Enzym auch positiv ausfiel.

Die Konstitution der synthetisierten Verbindung wurde durch IR-Spektrum bewiesen, in welchem die C≡N-Bande wie auch bei Bariumcyanoäthylphosphat bei 2290 cm-1 auftritt (Abb. 9), ferner durch UV-Spektrum mit Maxima bei 250 nm und 220 nm und durch elektrophoretischen und chromatographischen Nachweis von



9 a



9 b

Abb. 9: IR-Spektra von Bariumcyanoäthylphosphat (a) und O^2-2'-Cyclouridincyanoäthylphosphat (b)

Spongouridin nach alkalischer Hydrolyse und Phosphataseabbau.

Die mildesten für die Abspaltung der Cyanoäthylgruppe nötigen Bedingungen lauten nach Tener (32): eine Stunde, 60°C, 9 n Ammoniak.

Die kinetische Untersuchung der Spaltung von O^2-2'-Cyclouridin in halbkonzentriertem Ammoniak bei Zimmertemperatur zeigte schon nach 20 Minuten eine deutliche Verschiebung der Maxima von 250 nm zu längeren Wellenlängen, was einer Umwandlung von O^2-2'-Cyclouridin in Arabinouridin entspricht.

Das beschriebene Verfahren ist zur Darstellung von O^2-2'-Cyclouridincyanoäthylphosphat geeignet. Obwohl die Ausbeute bei 25% liegt, ist es wegen der Schwierigkeiten bei der Abspaltung der Cyanoäthylgruppe jedoch zur Darstellung von O^2-2'-Cyclouridinphosphat nicht zu verwenden.

b) Phosphorylierung mit Polyphosphorsäure

Ein weiteres Verfahren zur Phosphorylierung eines Nukleosids ist nach R.H. Hall und H.G. Khorana (34) unter Verwendung von Polyphosphorsäure möglich. Nach dem Ende der Reaktion werden Polyphosphate durch Kochen der sauren Reaktionslösung zerstört und anschließend mit Lithiumhydroxyd als Lithiumphosphate ausgefällt. Weder die saure Hydrolyse noch die Fällung der Phosphate in der alkalischen Lösung konnten bei Anwendung der Vorschrift für 5'-Acetyluridin-2'-toluolsulfonat durchgeführt werden, da bereits während der Reaktion teilweise O^2-2'-Cyclouridinphosphat entstand und dieses sowohl unter sauren als auch alkalischen Bedingungen instabil ist. Das anorganische Phosphat

konnte nach Adsorption des Nukleosids und Nukleotids an Aktivkohle mit Wasser herausgewaschen werden. Die Elution von Nukleosid und Nukleotid mit 50%igem Alkohol, der 0,25% Ammoniak enthielt, gelang allerdings nur zu 50% und damit wurden die Ausbeuten an O^2-2'-Cyclouridinphosphat sehr vermindert. Sie betrugen 10% (bezogen auf 5'-Acetyluridin-2'-toluolsulfonat). Neben O^2-2'-Cyclouridinphosphat lag auch 5'-Acetyl-O^2-2'-Cyclouridinphosphat vor.

c) Phosphorylierung mit Bistrichloräthylphosphochloridat

Von F. Eckstein wurde Bistrichloräthylphosphochloridat zur Phosphorylierung von Nukleosiden verwendet (35). Der Vorteil besteht darin, daß sich die beiden Trichloräthylreste reduktiv abspalten lassen, während sie sowohl im sauren als auch im alkalischen Medium stabil sind. 5'-Acetyluridin-2'-toluolsulfonat wurde nach der von Eckstein gegebenen Vorschrift phosphoryliert. Allerdings wurde die Reaktion bei Zimmertemperatur ausgeführt, während Eckstein bei 0^oC arbeitet. Die reduktive Spaltung erfolgte mit Zink/Kupfer in Dimethylformamid. Die ammoniakalische Hydrolyse zur Abspaltung des Toluolsulfonsäurerestes schloß sich an. An DEAE-Cellulose wurden anschliessend zwischen 20 und 25% O^2-2'-Cyclouridinphosphat abgetrennt. Diese Ausbeuten wurden für die geplante Polykondensation als ausreichend angesehen.

6. Polymerisation von O^2-2'-Cyclouridincyanoäthylphosphat

a) mit Diphenylphosphochloridat

Nach der von A.M. Michelson (30) benutzten Vorschrift für

Uridylsäure wurde O^2-2'-Cyclouridincyanoäthylphosphat in Dioxan gelöst und mit Diphenylphosphochloridat unter Zusatz von Tributylamin polymerisiert. Das alkalisch hydrolysierte Produkt wurde an einer Sephadex G-50-Säule aufgetrennt. Abb. 10 zeigt das Elutionsdiagramm. Die Hauptmenge des eingesetzten Materials lag noch als Mononukleotid vor, daneben wurden $(ara\text{-}Up)_2$ und cyclisches $(ara\text{-}Up)_2$ identifiziert (Ausbeute 15%).

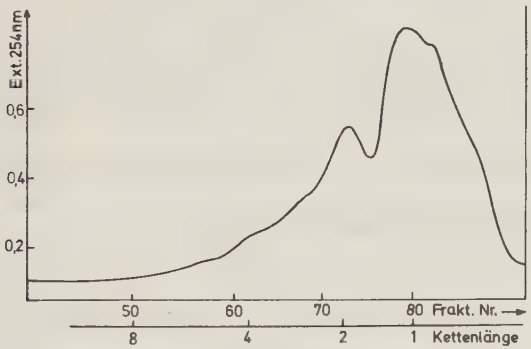


Abb. 10: Sephadex G-50-Elutionsdiagramm der Polymerisationsprodukte von O^2-2'-Cyclouridincyanoäthylphosphat mit Diphenylphosphochloridat

b) mit Dicyclohexylcarbodiimid

Beim Versuch, das Nukleotid in Pyridin mit Dicyclohexylcarbodiimid zu polymerisieren (36), fiel auf, daß es in wasserfreiem Pyridin nicht löslich war. Ein Gemisch aus Dimethylformamid und Pyridin wurde deshalb als Lösungsmittel verwendet. Das Ausmaß der Polymerisation ist ähnlich wie bei Verwendung von Diphenylphosphochloridat als Kondensationsmittel. Das als

Lösungsmittel benutzte Dimethylformamid ist nicht die Ursache des geringen Polymerisationsgrades, wie eine unter gleichen Bedingungen ausgeführte Kondensation von Polythymidylsäure bewies (Abb. 11). Es wurden Kettenlängen bis n=20 erreicht.

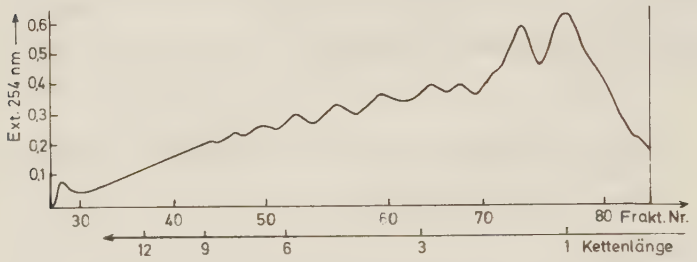


Abb. 11: Sephadex G-50-Elutionsdiagramm von Polythymidylsäure

c) mit Triisopropylbenzolsulfochlorid

Im Vorversuch gelang die Polymerisation von Uridylsäure mit Triisopropylbenzolsulfochlorid in Dimethylformamid bei Zusatz von äquivalenten Mengen Tributylamin (Abb. 12). Die Polykonden-

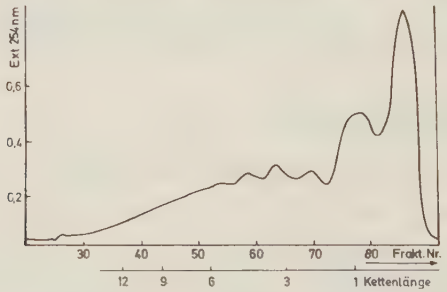


Abb. 12: Sephadex G-50-Elutionsdiagramm nach Polymerisation von Uridylsäure mit Triisopropylbenzolsulfochlorid

sation von O^2-2'-Cyclouridincyanoäthylphosphat nach dieser Vorschrift ergab jedoch Ausbeuten, die nicht höher waren als bei

Verwendung von Diphenylphosphochloridat oder Dicyclohexylcarbodiimid, wobei weder eine Variation der zugesetzten Tributylaminmenge noch eine Erhöhung der Reaktionstemperatur eine Verbesserung brachten. Der Verdacht lag nahe, daß bei Verwendung des Diesters die Aktivierung des Nukleotids durch das Kondensationsmittel und damit die Polymerisation erschwert wird. Deshalb wurde der Uridylsäuretrichloräthylester mit Triisopropylbenzolsulfochlorid in Dimethylformamid umgesetzt. Auch hier lag die Hauptmenge des eingesetzten Materials nach der Trennung an einer Sephadex G-50-Säule als Mononukleotid vor, wie Abb. 13 deutlich macht. Ein Vergleich der Sephadex G-50-Elutionsdiagramme der Polymerisationsprodukte von Uridinphosphorsäuremonoester (Abb.12) und von Uridinphosphorsäurediester (Abb. 13) macht es wahrscheinlich, daß die Verwendung des Diesters die Ursache des geringen Polymerisationsgrades darstellt.

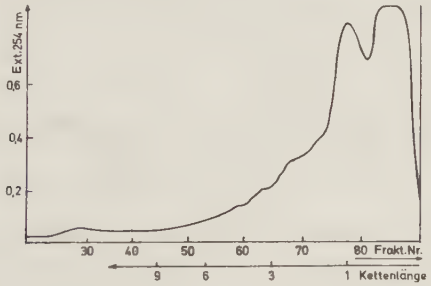


Abb. 13: Sephadex G-50-Elutionsdiagramm nach Polymerisation von Uridylsäuretrichloräthylester mit Triisopropylbenzolsulfochlorid

Aus diesem Grunde war O^2-2'-Cyclouridincyanoäthylphosphat als Ausgangsprodukt für die Polykondensation ungeeignet und weitere Polymerisationsversuche wurden mit O^2-2'-Cyclouridinphosphat durchgeführt.

7. Polymerisation von O^2-2'-Cyclouridinphosphat

Wie O^2-2'-Cyclouridincyanoäthylphosphat so ist auch O^2-2'-Cyclouridinphosphat schwer löslich. Die Lösung in Dimethylformamid darf geringe Mengen Pyridin enthalten, aber als alleiniges Lösungsmittel ist dieses nicht zu verwenden. Wegen der bereits erwähnten Vorteile (Abschnitt II/1) wurde Triisopropylbenzolsulfochlorid als Kondensationsmittel benutzt. Die Polymerisation lieferte Oligonukleotide der O^2-2'-Cyclouridylsäure bis zu Kettenlängen von n=10, wie die Molekulargewichtsbestimmung an einer Sephadex G-50-Säule ergab. Das Elutionsdiagramm zeigt Abb. 14. Die Ausbeute an Polymerisat mit einer Kettenlänge von n=3-10 betrug ca. 25%.

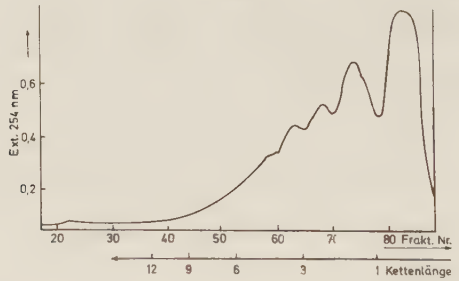


Abb. 14: Sephadex G-50-Elutionsdiagramm von Polycyclouridylsäure

Durch alkalische Hydrolyse wurden die Produkte in Oligoarabinouridylphosphat übergeführt und durch Phosphatbestimmungen und enzymatischen Abbau die Di- und Trinukleotide identifiziert.

Die Phosphatbestimmung der G-50-Fraktionen ergab ein molares Verhältnis von Nukleotid : Phosphat 1 : 1,07. Mit Snake venom

Enzym und Phosphatase waren 95% des Polykondensates bis zum Nukleosid abbaubar, welches elektrophoretisch und chromatographisch als Spongouridin identifiziert wurde. Durch Ribonuklease waren die gewonnenen Oligonukleotide nicht abbaubar und veränderten sich weder bei saurer Hydrolyse (5 Stunden, pH = 1, 100°C) noch bei alkalischer Hydrolyse (2 n Kalilauge, 37°C, 18 Stunden).

Diese Befunde stimmen somit in den wichtigsten Eigenschaften mit Polyspongouridylsäure (14) überein. Als besonderer Vorteil ist jedoch zu werten, daß bei der verwendeten Polykondensationsmethode ein wesentlich geringerer Prozentsatz überschüssiges Phosphat im Endprodukt vorliegt.

8. Biologische Eigenschaften von Polyspongouridylsäure

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, können bestimmte biologische Systeme durch Arabinonukleoside und-nukleotide eindeutig beeinflußt werden. Es war daher von Interesse, einige Wirkungen von Polyspongouridylsäure auf den Stoffwechsel tierischer Gewebekulturen zu untersuchen. Die tierischen Zellen wurden in einem Medium kultiviert, welches neben Salzen, Glucose und Glutamin auch Lactalbumin, Hefeextrakt, Vitamin B und Kälberserum enthielt. Wenn ein dichter Zellrasen vorhanden war, wurde dieses Nährmedium gegen ein Minimalmedium ausgetauscht, welches die letztgenannten Stoffe nicht enthielt. Die Überführung vom Nähr- ins Minimalmedium hat einen Übergang von der Wachstumsphase in den Ruhezustand zur Folge. Der Stoffwechsel sinkt langsam ab. Die geschilderten Versuche wurden mit Zellen durchgeführt, die sich im Übergangszustand befanden.

Es wurde zunächst die Wirkung von Polyspongouridylsäure auf die Protein- und RNS-Synthese in Abhängigkeit von der dem Minimalmedium zugesetzten Dosis Polyspongouridylsäure bei Hühnerfibroblasten geprüft. Nach fünfstündiger Einwirkung der Substanz wurde über 30 Minuten ein Puls mit ^{14}C-Leucin und ^{3}H-Uridin gegeben und danach der radioaktive Einbau in hochmolekulare Proteine und RNS gemessen. Die Einbauraten nehmen mit steigender Konzentration von Polyspongouridylsäure zu. Bei einer Konzentration von 0,2 mg/ml Medium ist für die Proteinsynthese der maximale Wert erreicht. Die RNS-Synthese wird auch bei Überschreitung dieser Dosis weiterhin gesteigert, aber die Zuwachsraten werden geringer.

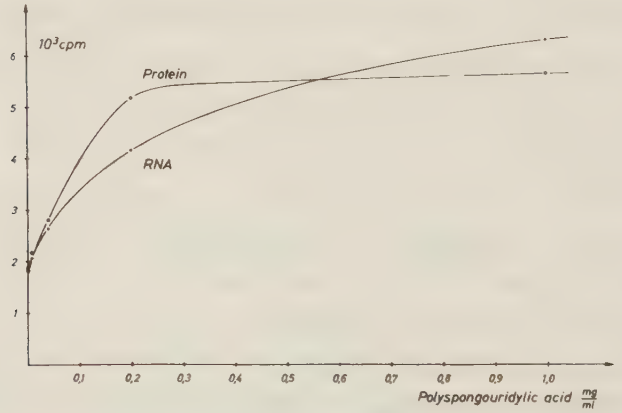


Abb. 15: Einbau von ^{3}H-Uridin in RNS und von ^{14}C-Leucin in Protein bei Hühnerfibroblasten unter Anwesenheit von Polyspongouridylsäure (Pulsdauer 30 Min. 37°C)

Die nun folgenden Versuche mit Hühnerfibroblasten und Mäuse-L-Zellen wurden bei einer Konzentration von 0,5 mg Polymer/ml

Medium durchgeführt. Es wurde der Einbau von ^{14}C-Uridin in die säurefällbare RNS-Fraktion und in das säurelösliche Nukleotidmaterial mit und ohne Polyspongouridylsäure untersucht. In Abb. 16a und 16b sind die Ergebnisse dargestellt. In Gegenwart von Polyspongouridylsäure wird der Einbau sowohl in säurefällbares als auch in säurelösliches Material erhöht. Die Steigerungsrate beträgt bei Hühnerfibroblasten ca. 50% und bei Mäuse-L-Zellen ca. 150%. Um zu sichern, daß der Stimulationseffekt tatsächlich vom Polymer und nicht von Abbauprodukten verursacht wird, wurde auch der Einfluß von Spongouridin und Spongouridin-5'-phosphat auf den ^{14}C-Uridin-Einbau in die RNS von L-Zellen geprüft. Bei Spongouridin war keine Wirkung, bei Spongouridin-5'-phosphat ein leichter Hemmeffekt feststellbar.

Um den Einfluß von Polyspongouridylsäure auf den Zellstoffwechsel weiter zu charakterisieren, wurde eine Vielzahl von Experimenten mit Mäuse-L-Zellen durchgeführt. Nach der Überführung der Zellen vom Nähr- ins Minimalmedium wurden Pulse von ^{14}C-Uridin gegeben und der Einbau in säurefällbares Material gemessen.

Abb. 17 zeigt, daß während fünf Stunden die erhaltenen Werte ständig absinken. Ist dagegen Polyspongouridylsäure im Minimalmedium enthalten, so bleibt der ursprüngliche Spiegel nahezu erhalten. Die Differenz in der RNS-Synthese zwischen mit Polyspongouridylsäure behandelten und nicht behandelten Zellen bewegte sich in ähnlichen Dimensionen wie bei den anfänglichen Versuchen.

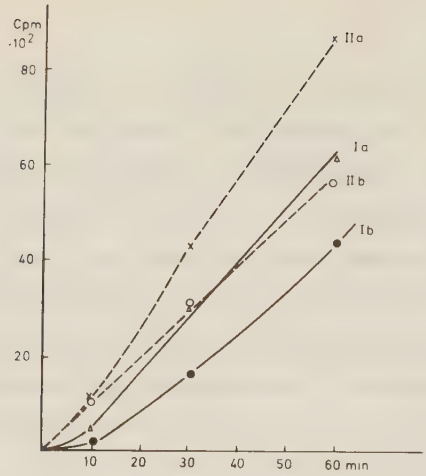


Abb. 16 a

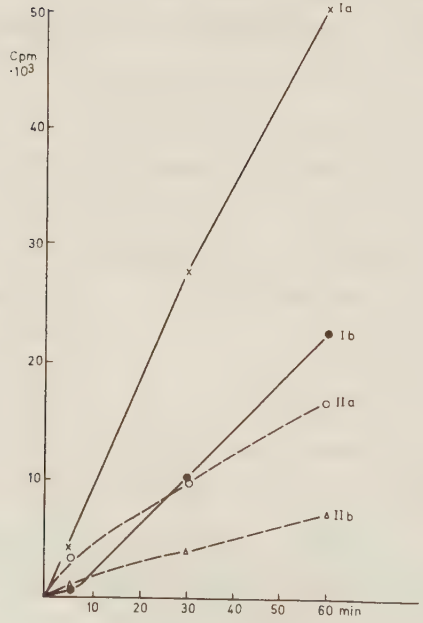


Abb. 16 b

Abb. 16 a und b: Einbau von ^{14}C-Uridin in die RNS von Hühnerfibroblasten (a) und Mäuse-L-Zellen (b)

I a säureunlösliche Fraktion + Polyspongouridylsäure
I b säureunlösliche Fraktion ohne Polyspongouridylsäure
II a säurelösliche Fraktion + Polyspongouridylsäure
II b säurelösliche Fraktion ohne Polyspongouridylsäure

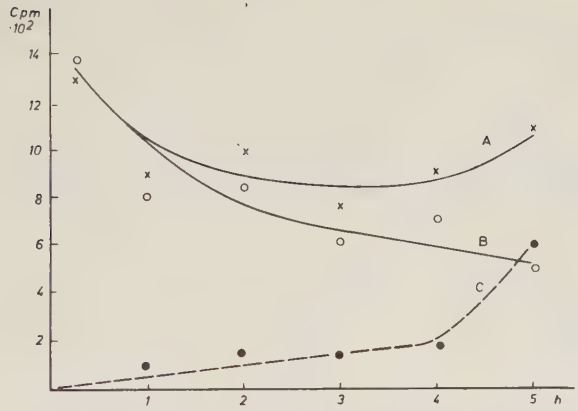


Abb. 17: Einbau von ^{14}C-Uridin in die RNS von Mäuse-L-Zellen (Pulsdauer 60 Min.)

A mit Polyspongouridylsäure
B ohne Polyspongouridylsäure
C Differenz A-B

Der Einbau von ^{3}H-Thymidin in die DNS von L-Zellen wurde in gleicher Weise untersucht. Obwohl die DNS-Synthese in den Kontrollen nach 5 Stunden fast aufgehört hatte, war sie in den mit Polyspongouridylsäure behandelten Zellen fast im ursprünglichen Umfang erhalten geblieben (Abb. 18). Bemerkenswert ist, daß Polyspongouridylsäure im kompletten Nährmedium und nach dem Eintritt der Zellen in den Ruhezustand keinen Effekt auf den Zellstoffwechsel hat. Im Übergangsstadium wird durch Polyspongouridylsäure die Abnahme der RNS-Synthese verhindert bzw. eingeschränkt. Eine Steigerung von RNS- oder DNS-Synthese über die Ausgangswerte wurde jedoch niemals beobachtet. Das Ausmaß des Stimulationseffektes hängt nicht nur vom Medium, sondern auch von der Zelldichte und einigen anderen Faktoren ab.

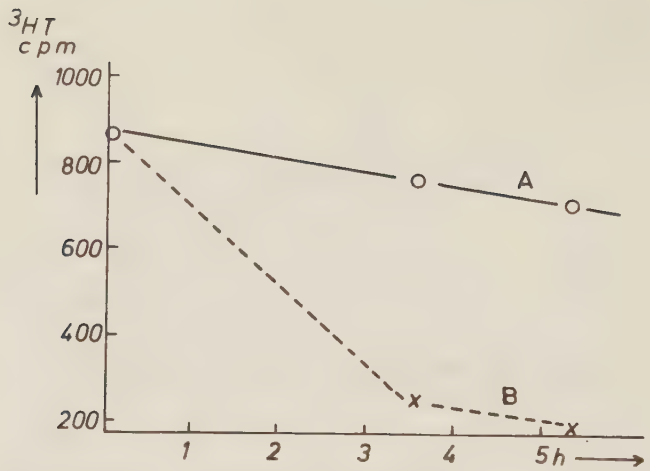


Abb. 18: Einbau von ^{3}H-Thymidin in die DNS von Mäuse-L-Zellen (Pulsdauer 45 Min.)

A mit Polyspongouridylsäure
B ohne Polyspongouridylsäure

Um die beobachteten Wirkungen auf den RNS-Stoffwechsel zu erklären, wurde die Beeinflussung der Uridinkinaseaktivität durch Polyspongouridylsäure untersucht. P. Hausen und H. Stein (37) zeigten nämlich, daß Uridinkinase das Schlüsselenzym für Aufnahme und Einbau von Uridin in die RNS darstellt, so wie die Thymidinkinase diese Funktion für Thymidin und den DNS-Stoffwechsel inne hat. In Kontrollversuchen zeigte sich, daß parallel zur DNS- und RNS-Synthese die Aktivität von Uridinkinase in den ins Minimalmedium gebrachten Zellen abnimmt. Bei Anwesenheit von Polyspongouridylsäure über 5 Stunden nach Mediumwechsel war die Uridinkinaseaktivität in L-Zellen-Extrakten jedoch siebenmal höher als in unbehandelten Zellen. Dieses Ergebnis

warf die Frage auf, ob es sich dabei um eine Enzymneusynthese handelte. Die Stimulierung des RNS-Stoffwechsels wurde in Gegenwart von Puromycin bzw. Cycloheximid untersucht. Von beiden Stoffen ist bekannt, daß sie die Proteinsynthese hemmen. Abb. 19 gibt den Einbau von ^{14}C-Uridin in L-Zellen in Gegenwart

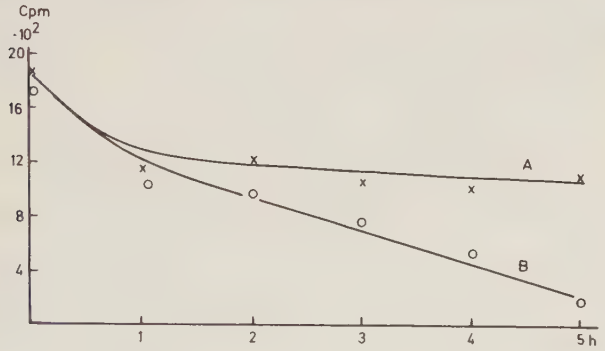


Abb. 19: Einbau von ^{14}C-Uridin in die RNS von Mäuse-L-Zellen in Gegenwart von Cycloheximid
A mit Polyspongouridylsäure
B ohne Polyspongouridylsäure

von Cycloheximid wieder. Während die RNS-Synthese im Kontrollversuch ständig absinkt, erreicht sie bei Anwesenheit von Polyspongouridylsäure im Minimalmedium nach einer Stunde ein konstantes Niveau. Die gefundenen Effekte sind ähnlich den ohne Zusatz von Cycloheximid erhaltenen. Ein Vergleich von Abb. 17 mit Abb. 19 zeigt, daß auch in Gegenwart von Cycloheximid mit Polyspongouridylsäure behandelte Zellen langsamer absterben als unbehandelte. Es ist demnach auszuschließen, daß Polyspongouridylsäure die Synthese von Uridinkinase induziert. Man muß

statt dessen annehmen, daß die Substanz als positiver Effektor für die Kinase oder als Hemmstoff für eine spezifische Phosphatase wirkt, die die Syntheseleistung der Kinase revertiert. Dabei kann Polyspongouridylsäure direkt oder indirekt beteiligt sein. In jedem Falle handelt es sich um eine Aktivierung, die zu einem höheren Einbau radioaktiv markierten Uridins in RNS führt.

III. Zusammenfassung und Diskussion

Die Synthese der Polyspongouridylsäure nach G. Schramm, I. Ulmer-Schürnbrand (14) wurde standardisiert, indem Temperatur- und Zeitabhängigkeit der Reaktion untersucht und die optimalen Bedingungen ausgearbeitet wurden. Der Aufarbeitungsgang wurde verbessert und die Ausbeuten wurden dadurch erhöht. Darüber hinaus konnten einige Endprodukte, das Arabinotetranukleotid und das -pentanukleotid, identifiziert werden.

Es wurde nach anderen Möglichkeiten der Synthese von Polyspongouridylsäure gesucht. Dabei stellte sich heraus, daß bei Verwendung von O^2-2'-Cyclouridinphosphat als Ausgangsprodukt die besten Ergebnisse zu erzielen sind. Die neu synthetisierte Polyarabinouridylsäure enthielt wesentlich weniger Überschußphosphat als die Polyspongouridylsäure von Schramm/Ulmer und wurde in höherer Ausbeute erhalten. Eine Schwierigkeit stellte die Gewinnung von O^2-2'-Cyclouridylsäure dar. Nach eingehender Untersuchung der Bedingungen, unter denen O^2-2'-Cyclouridylsäure entsteht, wurde der in Abb. 20 skizzierte Syntheseweg gewählt.

Die Anwendung der Vorschrift von Schramm/Ulmer auf die Synthese von Polyarabinocytidylsäure führte zu weniger einheitlichen Polymerisaten. Es wurden Produkte erhalten, die nur zu einem Drittel mit Snake venom Enzym und Phosphatase abbaubar waren und zuviel Phosphat enthielten. Infolge der gegenüber dem O^2-2'-Cyclouridinphosphat erhöhten Labilität des O^2-2'-Cyclocytidinphosphates muß angenommen werden, daß bei O^2-2'-Cyclocytidyl-

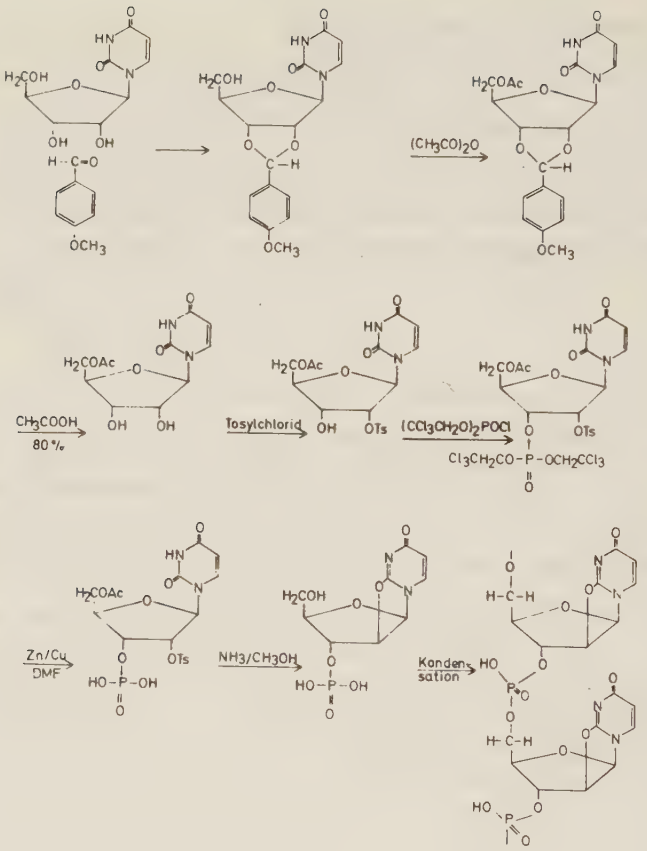


Abb. 20: Reaktionsschema der Synthese von Polyarabinouridylsäure

säure die Ätherbrücke bereits unter den sauren Polymerisationsbedingungen gespalten wird und damit sowohl die Hydroxylgruppe am C-2 der Base als auch die 2'-OH-Gruppe des Zuckers in die Reaktion einbezogen werden können, was einerseits zu einem großen Prozentsatz unnatürlicher und damit enzymatisch nicht abbaubarer Phosphordiesterbindungen und andererseits zur Bil-

dung schwer spaltbarer Phosphate und Pyrophosphate führt.

Die neu erarbeitete Vorschrift zur Darstellung von Polyarabinouridylsäure sollte jedoch im Prinzip auch für Polyarabinocytidylsäure anwendbar sein. Dabei müßte die Aminogruppe des Cytidins mit einer geeigneten Schutzgruppe blockiert werden.

Die Tatsachen, daß ara-Cytosin einen starken Hemmeffekt auf das Wachstum von Tumoren ausübt und daß Polycytidylsäure zusammen mit Polyinosylsäure in der Lage ist, Interferon, einen Virushemmstoff zu induzieren (42), machen weitere Syntheseversuche von Polyarabinocytidylsäure sowohl unter biologischen Aspekten als auch aus pharmakologischen Erwägungen sehr wünschenswert.

Die in dieser Arbeit untersuchten biologischen Effekte beschränken sich auf den Einfluß von Polyspongouridylsäure auf Mäuse-L-Zellen und Hühnerfibroblasten, die sich im Minimalmedium befanden. Dabei hat sich gezeigt, daß Polyspongouridylsäure die Synthese von RNS, DNS und Protein gegenüber den Kontrollwerten steigert, wie durch Messung der Einbauraten radioaktiv markierten Uridins, Thymidins und Leucins nachgewiesen wurde. Außerdem wurde die Uridinkinaseaktivität wesentlich erhöht, ohne daß eine de-novo-Synthese stattfand. Beim Ausmaß der am Nukleotidstoffwechsel beteiligten Faktoren und Rückkopplungsmechanismen sind Aussagen über die Wirkungsweise von Polyspongouridylsäure sehr schwer zu machen.

Eine Möglichkeit auf subzellulärer Basis den molekularen Wirkungsmechanismus zu klären, eröffnet sich durch Versuche im

"in-vitro"-System. So wäre die Prüfung interessant, ob die neu synthetisierte Polyarabinouridylsäure die Adaptation von Phenylalanyl-Transfer-RNS an Ribosomen stimuliert, da das Produkt von Schramm/Ulmer diese Fähigkeit zeigte, während Nagyvary sie mit seiner Polyarabinouridylsäure nicht bestätigen konnte. Wie eingangs erwähnt, enthält das erste Produkt überschüssiges Phosphat, während das Polymerisat von Nagyvary am 3'-Ende ein Ribonukleosid trägt. Die in dieser Arbeit neu synthetisierte Polyarabinouridylsäure sollte eine klare Entscheidung liefern, ob das Adaptationsvermögen des Schramm/Ulmer-Produktes auf spezifische oder unspezifische Wechselwirkung zurückzuführen ist. Es ist jedoch bisher nicht gelungen, für diese Versuche ausreichende Mengen, insbesondere von längeren Polyarabinouridylsäureketten, auf dem neuen Wege zu gewinnen und eine weitere Verbesserung der im Prinzip überlegenen Methode ist notwendig.

IV. Experimenteller Teil

Es wurden folgende Abkürzungen benutzt:

DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DMF	Dimethylformamid
La-He	Nährmedium
MM	Minimalmedium
PBS	Phosphatpuffer
PPE	Polyphenylphosphorsäureester
Up	Uridylsäure

1. Materialien und allgemeine Methoden

Die zur Synthese oder für Vergleichszwecke verwendeten Substanzen und die Enzyme wurden von folgenden Firmen erworben:

ara-U (A grade)	Calbiochem AG
Cytidin-2'-(3')-phosphorsäure	Fa. Waldhof
Polyuridylsäure	Calbiochem AG
Triisopropylbenzolsulfochlorid	The British Drug House Ltd.
Uridin	Fa. Waldhof
Uridin-2'-(3')-phosphat (Na-Salz)	Fa. Waldhof
Micrococcal-Nuclease	Fa. Worthington
alk. Phosphatase	Fa. Worthington
Ribonuklease	Mann Research Laboratories
Snake venom (Crotalus adamanteus)	Fa. Sigma
Spleendiesterase	Fa. Worthington

Inkubationen mit Phosphatase und Snake venom Enzym erfolgten in 0,05 m Trispuffer, 0,005 m Mg^+ pH = 8,8.

Phosphatbestimmungen wurden nach einem Aufschluß in 6 n Schwefelsäure nach einer Vorschrift von Martin und Doty (38) durchgeführt. Der Gehalt an freiem Phosphat wurde ohne Aufschluß ermittelt.

Zur Identifizierung einzelner Substanzen durch Papier- und Dünnschichtchromatographie wurden die folgenden Laufmittel verwendet:

A : n-Propanol : Ammoniak : Wasser = 55 : 10 : 35

B : n-Butanol : Essigsäure : Wasser = 5 : 1 : 3

C : Ammoniumacetat 1 m : Äthanol = 2 : 5

D: n-Butanol : Wasser = 86 : 14

Es wurde mit Schleicher-Schüll No. 2043 b Mgl.-Papier absteigend gearbeitet oder an Cellulose-, Polyäthylenimin- und Kieselgelplatten aufsteigend. Die Schichtdicke der Platten betrug 0,5 mm.

Elektrophoresen wurden an einer Apparatur nach V.M. Ingram, A.O.W. Stretton (43) durchgeführt. Der Boratpuffer wurde durch Einstellung einer gesättigten Borsäurelösung mit 10 n Natronlauge auf pH = 6 hergestellt. Die Elektrophoresebedingungen lauteten: 4 Stunden, 11 V/cm.

Extinktionsmessungen wurden an einem Zeiss-Spektralphotometer vorgenommen. UV-Spektren wurden an einem Beckman-Spektralphotometer automatisch aufgezeichnet. Ebenfalls automatisch erfolgte die Registrierung der Elutionsdiagramme der Säulenchromatographie mit einem LKB-Uvicord-Gerät. IR-Spektren wurden an einem Leitz-Spektrometer aufgenommen. Die Substanzen wurden dazu in Kaliumbromid eingepresst. Radioaktivitätsmessungen wurden mit einem Packard-Tri-Carb-Szintillationszähler durchgeführt.

2. Darstellung von Nukleosiden und Nukleotiden

a) 5'-Acetyluridin-2'-3'-cyclophosphat (39)
5'-Acetyluridin-3'-phosphat

3 mM Uridin-2'-(3')-phosphorsäure wurden in 9 ml Wasser gelöst und mit 2,3 ml Tributylamin und 0,6 ml Chlorameisensäureäthylester 10 Minuten geschüttelt. Nach Zugabe weiterer 0,3 ml Chlorameisensäureäthylester wurde nochmals 5 Minuten geschüttelt. Nach Evaporation wurde der Rückstand in 9 ml DMF und 9 ml Dioxan gelöst und 48 Stunden bei Raumtemperatur mit 1,5 ml Essigsäureanhydrid und 4,35 ml Tributylamin behandelt. Nach Entfernung der Lösungsmittel wurde das 5'-Acetyluridin-2'-3'-cyclophosphat durch Äther als brauner Sirup abgeschieden und durch wiederholte Umfällung mit Äther aus Alkohol gereinigt und dann getrocknet.

Zur Gewinnung von 5'-Acetyluridin-3'-phosphat wurden 200 mg 5'-Acetyluridin-2'-3'-cyclophosphat in 16 ml Wasser gelöst und mit 4 ml Ribonukleaselösung (2 mg in 4 ml Wasser) 15 Stunden bei 37°C inkubiert.

b) Triäthylamincytidin-2'(3')-phosphat (39)
Tributylamin-N-acetylcytidin-2'-3'-cyclophosphat

1 mM Cytidin-2'-(3')-phosphorsäure wurde unter Zusatz von 1 ml Triäthylamin in 10 ml Methanol gelöst. Am Rotavapor wurde zur Trockne eingedampft. Der voluminöse weiße Rückstand, das Triäthylamincytidin-2'(3')-phosphat, wurde 1 Stunde bei 105°C getrocknet.

Zur Darstellung von Tributylamin-N-acetylcytidin-2'-3'-cyclophosphat wurden 5 mM Cytidin-2'(3')-phosphorsäure in 3,6 ml Tributylamin und 15 ml Wasser gelöst und mit 1 ml Chlorameisensäureäthylester 5 Minuten kräftig geschüttelt. Am Rotavapor wurde das Wasser abgedampft und mehrmals mit trockenem Dioxan evaporiert, dann wurden 15 ml DMF und 15 ml Dioxan, 2,3 ml Tributylamin und 0,5 ml Essigsäureanhydrid zugefügt und 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen. Das Lösungsmittel wurde danach abgedampft und das Tributylamin-N-acetylcytidin-2'-3'-cyclophosphat mit Äther gefällt, mehrmals mit Äther gewaschen und dann getrocknet.

c) 5'-Acetyluridin-2'-toluolsulfonat

Die von A.R. Todd gegebene Vorschrift (28) wurde variiert. Sie geht vom Uridin aus. Zum Schutz von 2'- und 3'-OH-Gruppe wurde zunächst der auch von A.R. Todd et al. verwendete Isopropylidenrest benutzt. Später wurde die Anysilidengruppe (31) verwendet, da sie leichter hydrolysierbar ist.

10 g Uridin wurden mit 20 g wasserfreiem Zinkchlorid und 50 ml p-Anisaldehyd vier Tage lang geschüttelt. Das halbfeste Produkt wurde mit insgesamt 2 l Äther, danach mit 1 l kaltem Wasser extrahiert und anschließend aus kochendem Wasser das 2'-3'-Anisylidenuridin kristallisiert.
Ausbeute 70% Schmelzpunkt 211°C

10 g Anisylidenuridin wurden in 85 ml Pyridin gelöst und mit 12,5 ml Essigsäureanhydrid vier Stunden bei Raumtemperatur acetyliert. Dann wurde mehrmals mit Methanol evaporiert, in

275 ml 80%iger Essigsäure gelöst und 10 Stunden bei Raumtemperatur hydrolysiert. Nach Entfernung der Essigsäure wurde mehrmals mit Äthanol abgedampft und schließlich aus Äthanol kristallisiert. Wenn aus der Lösung ein Öl ausfiel, wurde die auf ca. 5 ml eingeengte Lösung auf eine Kieselgelsäule gegeben und mit Essigester eluiert. Durch Dünnschichtchromatographie an Cellulose im B-System wurden die Fraktionen, die 5'-Acetyluridin enthielten, ermittelt, gesammelt und das Nukleosid in üblicher Weise kristallisiert.

Ausbeute 32% Schmelzpunkt 174°C

2,5 g 5'-Acetyluridin wurden in 13,75 ml Pyridin gelöst und 12 Stunden lang bei Raumtemperatur mit 1,75 g p-Toluolsulfochlorid behandelt. Das Pyridin wurde durch mehrmalige Evaporation mit Äthanol entfernt und zu der hellgelben zähen Masse 75 ml Wasser zugefügt und mehrere Tage stehengelassen. Der Niederschlag wurde gesammelt, mit ca. 10 ml Äthanol verrieben und das in Äthanol unlösliche 5'-Acetyluridin-2'-toluolsulfonat aus Methanol kristallisiert.

Ausbeute 23% Schmelzpunkt 176°C

Auf Uridin bezogen betrug die Ausbeute an 5'-Acetyluridin-2'-toluolsulfonat 5%.

d) O^2-2'-Cyclouridincyanoäthylphosphat

Die Phosphorylierung von 5'-Acetyluridin-2'-toluolsulfonat erfolgte nach der Vorschrift von G.M. Tener (32) für die Phosphorylierung von Nukleosiden.

1 mM 5'-Acetyluridin-2'-toluolsulfonat wurde in 10 ml Pyridin gelöst und mit 4 ml Cyanoäthylphosphatlösung (= 4 mM) und

2,5 g DCC zwei Tage bei Raumtemperatur behandelt. Nach Zusatz von 10 ml Wasser wurde 2 Stunden geschüttelt, vom Harnstoff abfiltriert, die Lösung wiederholt mit Wasser abgedampft, dann mit 20 ml Methanol und 20 ml methanolischem Ammoniak 7 Stunden bei Raumtemperatur hydrolysiert. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels wurde in Wasser gelöst und an einer DEAE-Cellulose-Säule (2,5 cm × 25 cm) mit einem Gradienten, 0-0,1 m Ammoniumbicarbonat (pH = 8,6) je 750 ml, aufgetrennt. Ca. 25% betrug die Ausbeute an O^2-2'-Cyclouridincyanoäthylphosphat, welches in den Fraktionen 8-22 eluiert wurde (Abb. 21).

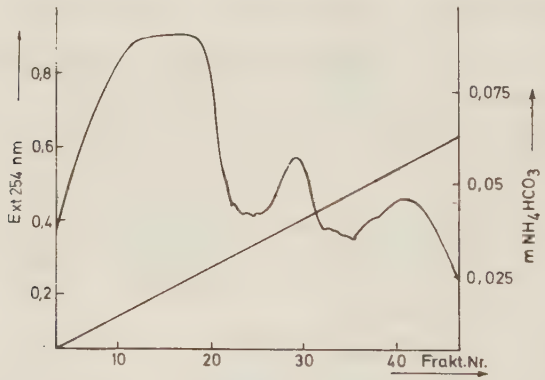


Abb. 21: DEAE-Cellulose-Elutionsdiagramm von O^2-2'-Cyclouridincyanoäthylphosphat

e) Umsetzung von 5'-Acetyluridin-3'-phosphat mit PPE bzw. mit Diphenylphosphochloridat

0,1 mM 5'-Acetyluridin-2'-3'-cyclophosphat wurden mit 0,5 g PPE bei 60°C bzw. bei 90°C behandelt. Der klare braune Sirup wurde mit Chloroform ausgeschüttelt, der Rückstand mit Chloro-

form gewaschen. Danach wurde ein Spektrum aufgenommen. Zur Bestimmung der Zeitabhängigkeit der Bildung von O^2-2'-Cyclonukleotid wurden nach 1, 2, 5, 10 Stunden Proben entnommen und in der oben beschriebenen Weise aufgearbeitet. Das Spektrum veränderte sich nach einer Stunde nicht mehr. Nach alkalischer Hydrolyse (0,1 n NaOH 2 Minuten 0^oC) zur Abspaltung der Acetylgruppe wurde die Auftrennung der Reaktionsprodukte an einer DEAE-Cellulose-Säule durch Gradientenelution und an einer Cellulose-Säule mit dem Laufmittel C versucht. Die Elutionsdiagramme zeigten sehr unscharfe Peaks, von denen keiner ein einwandfreies Cyclospektrum lieferte.

Weitere Versuche wurden mit dem Tributylaminsalz des 5'-Acetyluridin-2'-3'-cyclophosphats unternommen. Es wurde nur die halbe PPE-Menge des Standardansatzes verwendet. Dieser wurde ferner durch Zusatz von 1 ml Phosphorsäuretrisdimethylamid oder DMF abgewandelt und die Bildung von O^2-2'-Cyclo-Up wiederum an Hand der Spektra verfolgt.

0,1 mM 5'-Acetyluridin-2'-3'-cyclophosphat wurden mit 0,2 g Diphenylphosphochloridat 12 Stunden bei 60^oC gehalten, danach war die Lösung schwarz gefärbt.

f) Umsetzung von 5'-Acetyluridin-3'-phosphat und 5'-Acetyluridin-2'-3'-cyclophosphat mit Toluolsulfochlorid

0,5 mM 5'-Acetyluridin-3'-phosphat wurden in 5 ml Pyridin gelöst und nach Zusatz von 1,1 mM p-Toluolsulfochlorid 18 Stunden bei Zimmertemperatur gehalten, zunächst mit Alkohol, dann mit Wasser abgedampft und anschließend papierchromatographisch im

System C getrennt. Das Chromatogramm zeigte 5'-Acetyluridin-2'-3'-cyclophosphat und Toluolsulfonsäure neben wenig 5'-Acetyluridin-3'-phosphat.

Der gleiche Versuch wurde mit 5'-Acetyluridin-2'-3'-cyclophosphat durchgeführt und ein Papierchromatogramm zeigte, daß sich das Nukleotid nicht verändert hatte.

g) O^2-2'-Cyclouridinphosphat

Bistrichloräthylphosphochloridat wurde analog der in Houben-Weyl gegebenen Vorschrift für Bistrifluoräthylphosphochloridat hergestellt (40). Es wurde versucht, möglichst wasserfrei zu arbeiten.

74,7 g (= 0,5 M) Trichloräthanol, 36,2 ml Äther und 39,5 g (= 0,5 M) Pyridin wurden gemischt und zu einer im Eisbad befindlichen Lösung von 38,4 g (= 0,25 M) Phosphoroxytrichlorid und 53,8 ml Äther innerhalb von 2 Stunden unter beständigem Rühren zugetropft. Eine Stunde lang wurde bei Raumtemperatur nachgerührt, vom ausgefallenen Pyridinhydrochlorid abfiltriert, dieses zweimal mit Äther nachgewaschen und die vereinigte ätherische Lösung eingeengt, bis die Flüssigkeit ölartige Konsistenz erreichte. Sie wurde dann über Nacht bei 0°C aufbewahrt. Die ausgefallenen Kristalle wurden auf einem Tonteller gesammelt, auf diese Weise von anhaftendem Öl getrennt und im Exsikkator über Phosphorpentoxyd getrocknet.
Ausbeute 35% Schmelzpunkt 40-44°C

Die Phosphorylierung von 5'-Acetyluridin-2'-toluolsulfonat mit Bistrichloräthylphosphochloridat erfolgte nach einer abgewan-

delten Vorschrift von F. Eckstein (35).

0,1 mM 5'-Acetyluridin-2'-toluolsulfonat wurden in 0,5 ml Pyridin gelöst und mit 0,2 mM Bistrichloräthylphosphochloridat 15 Stunden bei Zimmertemperatur behandelt. Nach Evaporation wurde in 5 ml Chloroform gelöst und viermal mit je 2,5 ml Wasser extrahiert. Die Chloroformlösung wurde zur Trockne eingeengt und in 10 ml DMF gelöst, 1 g Zink-Kupfer-Staub (Le Goff) zugefügt und 1 Stunde lang bei 50°C gerührt. Es wurde vom Zinkstaub abfiltriert und dieser portionsweise mit 10 ml Pyridin-Wasser (9 : 1) gewaschen. Filtrat und Waschlösung wurden evaporiert, mit Hilfe von Dowex 50-H^+ in Wasser gelöst und diese Lösung über eine Dowex 50-H^+-Säule von Zinkionen befreit. Nach Evaporation des Eluats wurde der Rückstand in 4 ml halbkonzentriertem methanolischem Ammoniak gelöst und 7 Stunden bei Raumtemperatur hydrolysiert. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde der Rückstand in 0,01 m Ammoniumbicarbonat gelöst und über eine DEAE-Cellulose-Säule (2,5 cm × 15 cm) aufgetrennt (Abb. 22).

Die Fraktionen 22-27 enthielten Toluolsulfonsäure, wie das Aromatenspektrum zeigte. Die Fraktionen 36-41 enthielten O^2-2'-Cyclouridylsäure und in den Fraktionen 46-52 wurde Isocytosinphosphat eluiert. Durch Bestimmung des Phosphatgehaltes und Identifikation der nach Phosphataseabbau erhaltenen Nukleoside wurde dies bewiesen. Die Ausbeute an O^2-2'-Cyclouridinphosphat betrug im Durchschnitt 20%.

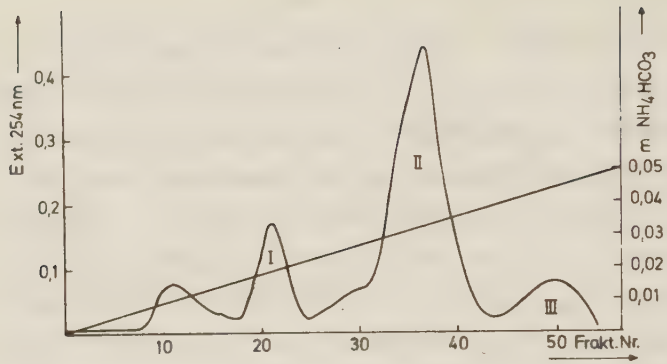


Abb. 22: DEAE-Cellulose-Elutionsdiagramm von O^2-2'-Cyclouridylsäure

3. Modifikation der Synthese von Polyspongouridylsäure nach G. Schramm, I. Ulmer-Schürnbrand

Nach Modifikation der Synthesevorschrift für Polyspongouridylsäure von G. Schramm, I. Ulmer-Schürnbrand wurde wie folgt gearbeitet:

1 g Uridin-(2')-3'-phosphat (Dinatriumsalz) wurde mit 11 g PPE 24 Stunden bei 100°C behandelt. Der homogene Sirup wurde in 100 ml Butanol gelöst, wobei ein Sediment ausfiel. Es wurde zweimal mit je 100 ml Butanol gewaschen und dann in Wasser gelöst. Die wässrige Lösung wurde so verdünnt, daß je 100 ml 6000 optische Dichteeinheiten (260 nm) enthielten. Die wässrige Lösung wurde dann mit 60%iger Perchlorsäure auf pH = 1 gebracht und 5 Stunden auf 90°C erhitzt. Anschließend wurde die Perchlorsäure mit 10 n Kalilauge ausgefällt und die Suspension zentrifugiert. Der Überstand wurde auf ein Volumen von 10-20 ml

eingeengt. Dabei fiel nochmals Kaliumperchlorat aus. Es wurde abzentrifugiert. Die verbleibende Lösung wurde an DEAE-Cellulose und an Sephadex G-50 chromatographiert.

4. Polymerisation von Cytidylsäure mit Polyphenylphosphorsäureester

1 mM Triäthylamin-2'(3')-cytidinphosphat wurde mit 4 g PPE unter Zusatz von 1 ml Triäthylamin 36 Stunden in einem gut verschlossenen Kolben im Ölbad bei 60°C bewegt. Der homogene braune Sirup wurde in 50 ml Butanol unter leichtem Schütteln gelöst. Ein hellgelb gefärbtes Sediment wurde durch Zentrifugation abgetrennt und zweimal mit je 30 ml Butanol gewaschen. Es wurde in Wasser gelöst, das restliche Butanol am Rotavapor entfernt und durch Messung der Extinktion der Gehalt an UV-absorbierendem Material bestimmt (19-25%). Dieses wurde in 35 ml 2 n Kalilauge 2 Stunden bei 37°C hydrolysiert. Mit 60%iger Perchlorsäure wurde die Lösung auf pH = 1 gebracht und nach dem Abzentrifugieren von Kaliumperchlorat 5 Stunden bei 90°C gehalten, dann mit Kalilauge neutralisiert. Über Nacht wurde die Lösung gegen destilliertes Wasser dialysiert. 5% der ursprünglich eingesetzten Nukleotidmenge waren danach noch vorhanden. An einer DEAE-Cellulose-Säule (2,5 cm × 25 cm) wurde das Polymerisat aufgetrennt mit einem Gradienten 0-0,3 m Ammoniumbicarbonat, pH = 8,6 (Gesamtelutionsmenge 2 l). Mit 1 m Ammoniumbicarbonat wurde der Rest von der Säule gewaschen. Die nach 0,2 m eluierten Fraktionen wurden einschließlich des 1 m-Peaks auf ca. 15 ml eingeengt und über eine G-25-Säule durch Elution mit Wasser entsalzt. An einer

Sephadex G-75-Säule (2,8 cm × 145 cm) wurden die Kettenlängen bestimmt. Sie reichten bis n=10 (Abb. 5).
Phosphatbestimmungen, Essigsäureanhydridbehandlung, sowie Abbauversuche wurden mit Proben des auf die G-75-Säule aufgetragenen Materials durchgeführt. Das molare Verhältnis Cytidylsäure-Extinktion : Phosphat betrug 1 : 2 bis 1 : 2,5 und war durch Essigsäureanhydridbehandlung nicht zu verringern, mit Phosphatase wurden bis 20% Phosphat abgespalten, ca. 35% des Produktes waren enzymatisch bis zum Nukleosid abbaubar.

Die Polymerisation von Tributylamin-N-acetyl-cytidin-2'-3'-cyclophosphat erfolgte analog obiger Vorschrift unter Weglassung des Triäthylamins. Das Reaktionsgemisch war nur leicht braun gefärbt. Alle sonstigen Daten lagen innerhalb der für die Triäthylamincytidinphosphat-Polymerisation gegebenen Durchschnittswerte.

5. Polymerisation von O^2-2'-cyclouridincyanoäthylphosphat

a) mit Diphenylphosphochloridat

0,125 mM O^2-2'-cyclouridincyanoäthylphosphorsäure wurden in Wasser gelöst und nach Zusatz von 0,035 ml Tributylamin erfolgte mehrmalige Evaporation mit Dioxan. Der wasserfreie Rückstand wurde in 0,7 ml Dioxan gelöst und mit 0,05 ml Diphenylphosphochloridat und 0,15 ml Tributylamin 3 Stunden bei Zimmertemperatur behandelt. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde das Polymerisat mit Äther gefällt, in 5 ml 0,1 n Kalilauge gelöst und zur Entfernung von Tributylamin zweimal mit Äther ausgeschüttelt. Nach zweistündiger Hydrolyse bei 37°C wurde

die alkalische Lösung mit Dowex-50 H^+ neutralisiert und nach Zusatz einiger Tropfen Ammoniumbicarbonatlösung über eine Sephadex G-50-Säule (3,1 cm × 155 cm) gegeben (Abb. 10). Das gesammelte Eluat wurde über eine Sephadex G-10-Säule entsalzt und dann an einer DEAE-Cellulose-Säule aufgetrennt. Mittels enzymatischen Abbaus, Chromatographie und Phosphatbestimmungen wurden einzelne Peaks identifiziert.

b) mit DCC

0,1 mM Cyclouridincyanoäthylphosphat (Ammoniumsalz) wurden durch wiederholte Evaporation mit Pyridin wasserfrei gemacht, in 0,15 ml DMF und 0,3 ml Pyridin gelöst und nach Zusatz von 0,2 g DCC drei Tage lang bei Zimmertemperatur geschüttelt. Nach dieser Zeit wurden 2 ml Pyridin und 1 ml Wasser zugefügt, die Lösung zur Entfernung unveränderten Kondensationsmittels mit Petroläther extrahiert, vom unlöslichen Harnstoff abfiltriert und zur Zerstörung von Pyrophosphaten 12 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend erfolgte alkalische Hydrolyse (3 ml 0,1 n Kalilauge, 4 Stunden, 37°C), Neutralisation mit Perchlorsäure und Auftrennung der von ausgefallenem Kaliumperchlorat befreiten Lösung an einer Sephadex G-50-Säule, wobei ein ähnliches Elutionsdiagramm wie bei der Polymerisation mit Diphenylphosphochloridat erhalten wurde.
Bei einer unter gleichen Bedingungen durchgeführten Polymerisation von Thymidylsäure wurden Kettenlängen bis n=20 erreicht. Hochpolymeres Material erschien im Ausschlußpeak einer Sephadex G-50-Säule (Abb. 11).

c) mit Triisopropylbenzolsulfochlorid

0,1 mM O^2-2'-Cyclouridincyanoäthylphosphat wurden in DMF gelöst und durch wiederholtes Eindampfen mit Pyridin wasserfrei gemacht. Einem Volumen von 1 ml DMF-Lösung wurden 100 mg (0,3 mM) Triisopropylbenzolsulfochlorid und 80 µl (0,6 mM) Tributylamin zugefügt und 12 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt, danach wurden gleiche Mengen Kondensationsmittel und Tributylamin hinzugefügt und nochmals 24 Stunden geschüttelt. Nach Zusatz von 2 ml Wasser wurde die Lösung einige Stunden lang stehengelassen und danach mehrmals mit Wasser abgedampft. Der Rückstand wurde unter Zusatz einiger Tropfen Ammoniumbicarbonatlösung gelöst und die filtrierte Lösung auf eine Sephadex G-50-Säule aufgetragen.

6. Polymerisation von O^2-2'-Cyclouridinphosphat

0,05 mM Pyridiniumsalz von O^2-2'-Cyclouridylsäure wurden durch mehrmaliges Eindampfen mit Pyridin wasserfrei gemacht, in 1 ml DMF gelöst, mit 50 mg Triisopropylbenzolsulfochlorid und 40 µl Tributylamin 12 Stunden geschüttelt und nach Zugabe der gleichen Mengen Kondensationsmittel und Tributylamin nochmals 24 Stunden geschüttelt. Nach Zusatz von Wasser wurde einige Stunden stehengelassen, mehrmals mit Wasser evaporiert, in 0,01 m Ammoniumbicarbonat (pH = 8,6) gelöst und die nach Filtration klare Lösung auf eine Sephadex G-50-Säule (3,1 cm × 155 cm) aufgetragen. Das Elutionsdiagramm zeigt Abb. 14.

Das Sephadex G-50-Eluat wurde zur Trockne eingeengt und mit 3 ml 0,2 n Natronlauge eine Stunde bei 50°C hydrolysiert, dann mit

Dowex-50 H^+ neutralisiert und wiederum über Sephadex G-50 gegeben. Produkte mit einer Kettenlänge von n=1-3 wurden über eine DEAE-Cellulose-Säule aufgetrennt und die einzelnen Peaks in üblicher Weise identifiziert.

7. Biologische Versuche

Die verwendete Polyspongouridylsäure wurde nach der standardisierten Vorschrift von G. Schramm, I. Ulmer-Schürnbrand (14) synthetisiert. Die höheren Polymeren wurden mit 0,3 - 1 m Ammoniumbicarbonat von einer DEAE-Cellulose-Säule eluiert. Nach dem Entsalzen wurde an einer Sephadex G-50-Säule das Molekulargewicht bestimmt und Produkte mit einer Kettenlänge von n=5-15 für die Versuche verwendet. Spongouridin-5'-phosphat wurde durch Phosphorylierung käuflichen Spongouridins nach der Vorschrift von G.M. Tener (32) gewonnen.

Hühnerfibroblasten von elf Tage alten Embryonen und Mäuse-L-Zellen wurden freundlicherweise von Prof. W. Schäfer zur Verfügung gestellt. Das Minimalmedium (MM) enthielt in 5 l: 36 g NaCl, 2 g KCl, 0,625 g NaH_2PO_4, 5 g Glucose, 1,5 g Glutamin, 1 g $CaCl_2$; H_2O, 1 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 5,5 g $NaHCO_3$, 0,08 g Phenolrot, 500 000 IE Penicillin und 0,25 g Streptomycin. Das Nährmedium (LaHe) enthielt außerdem noch 25 g Lactalbumin, 0,5 g Hefeextrakt, 5 ml Vitamin B-Lösung und 15% Kälberserum. Phosphatpuffer (PBS) wurde nach der Vorschrift von Dulbecco (41) hergestellt.

Die Zellen wurden zunächst in komplettem LaHe-Medium kultiviert, dann auf Plastikpetrischalen (Ø 5 cm) gebracht und in LaHe-

Medium 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach war ein dichter Zellrasen vorhanden (2×10^6 Zellen/Platte). Das Nährmedium wurde jetzt entfernt und nach dem Waschen der Zellen mit PBS durch 2 ml MM und 1 ml PBS (pH = 7,2) pro Platte ersetzt. Für die Testplatten wurden 1,5 mg Polyspongouridylsäure oder dieselben Werte von Spongouridin oder Spongouridin-5'-phosphat im PBS gelöst (= 0,5 mg/ml). Die Platten wurden maximal für 5 Stunden bei 37°C unter Kohlendioxydatmosphäre inkubiert. Für die Pulsexperimente wurden 8 µg ^{14}C-Uridin oder ^{3}H-Thymidin pro Platte zugegeben. Nach unterschiedlicher Dauer wurde der Puls durch Beseitigung des Mediums und Waschen der Platten mit eiskaltem PBS gestoppt. Mit 0,25%iger kalter Versenlösung wurden die Zellen von den Platten gespült und zentrifugiert. Das Sediment wurde in 5%iger Trichloressigsäure suspendiert und das säureunlösliche Material auf Membranfiltern gesammelt. Die auf den getrockneten Filtern haftende Radioaktivität wurde in Szintillationsflüssigkeit als Counts/Min. gezählt.

Um die Uridinkinaseaktivität zu bestimmen, wurden L-Zellen, welche 5 Stunden lang mit Polyspongouridylsäure in MM und Kontrollen, welche ohne Polyspongouridylsäure inkubiert worden waren, durch dreimaliges Frieren und Tauen zerstört. Es wurde zentrifugiert. Das Enzym befand sich im Überstand. Proben desselben wurden mit ^{14}C-Uridin und Adenosintriphosphat 30 Min. bei 37°C inkubiert und durch Dünnschichtchromatographie an Polyäthyleniminplatten und Elution der Nukleotide das Ausmaß der Phosphorylierung bestimmt (37). Kontrollexperimente zeigten, daß die gemessene Aktivität den Extraktmengen proportional war.

Literatur

Übersichten wurden entnommen aus

A.M. Michelson: The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides, Academic Press New York, 1963.

S.S. Cohen: Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, 5, 2-82 (1966), Academic Press New York.

1. A.E. Mirsky, Scientific American 6, 78 (1968).
2. O.T. Avery, C.M. MacLeod, M. McCarty, J. exp. Med. 79, 137 (1944)
3. J.S. Evans et al., Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. 106, 350 (1961).
4. M.Y. Chu, G.A. Fischer, Biochem.Pharmacol. 11, 423 (1962).
5. A.P. Kimball, G.A. Le Page, P.S. Allinson, Canc.Res. 27, 106 (1967).
6. J.S. Evans, G.D. Mengel, Biochem.Pharmacol. 13, 989 (1964).
7. A.P. Kimball, M.J. Wilson, Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. 127, 429 (1968).
8. E.C. Moore, S.S. Cohen, J.Biol.Chem. 242, 2116 (1967).
9. J.J. Furth, S.S. Cohen, Canc. Res. 28, 2061 (1968).
10. W. Bergmann, R.J. Feeney, J.Am.Chem.Soc. 72, 2809 (1950).
11. W. Bergmann, R.J. Feeney, J. Org. Chem. 16, 981 (1951).
12. P.T. Cardeilhac, S.S. Cohen, Canc. Res. 24, 1595 (1964).
13. J. Nagyvary, R. Provenzale, J.M. Clark, Biochem.Biophys. Res. Comm. 31, 508 (1968).
14. G. Schramm, I. Ulmer-Schürnbrand, BBA 145, 7 (1967).
15. F. Cramer, Angew. Chem. 78, 186 (1966).
16. F.N. Hayes, E. Hansbury, J. Am. Chem. Soc. 86, 4172 (1964).
17. D.H. Rammler, Y. Lapidot, H.G. Khorana, J.Am.Chem.Soc. 85, 1989 (1963).
18. F. Cramer, H. Köster, Angew. Chem. 80, 488 (1968).
19. R. Lohrmann, H.G. Khorana, J. Am. Chem. Soc. 88, 829 (1966).
20. R.L. Letsinger, Kelvin K. Ogilvie, J. Am. Chem. Soc. 89, 4801 (1967).

21. J. Nagyvary, Fed.Proc. 26, No. 2, 292 (1967).

22. J. Nagyvary, XXI. Congress of JUPAC Prague (1967) Abstract No. 48.

23. J. Nagyvary, persönl. Mitteilung an G. Schramm.

24. H.G. Khorana, J.P. Vizsolyi, R.K. Ralph, J. Am. Chem. Soc. 84, 414 (1962).

25. Th. Hohn, H. Schaller, BBA 138, 466 (1967).

26. H.G. Khorana, J. Am. Chem. Soc. 86, 2931 (1964).

27. E.R. Walwick, W.K. Roberts, C.A. Decker, Proc. Chem. Soc. 84 (1959).

28. D.M. Brown, A.R. Todd, S. Varadarajan, J.Chem.Soc. 2388 (1956).

29. J.F. Codington, R. Fecher, J.J. Fox, J.Am.Chem.Soc. 82, 2794 (1960).

30. A.M. Michelson, J. Chem. Soc. 1371 (1959).

31. D.H. Rammler, H.G. Khorana, J.Am.Chem.Soc. 31, 508 (1968).

32. G.M. Tener, J. Am. Chem. Soc. 83, 159 (1961).

33. W.E. Razzell, H.G. Khorana, J. Biol. Chem. 236, 1144 (1961).

34. R.H. Hall, H.G. Khorana, J. Am. Chem. Soc. 77, 1871 (1955).

35. F. Eckstein, Chem. Ber. 100, 2228 (1967).

36. M. Smith, J.G. Moffat, H.G. Khorana, J.Am.Chem.Soc. 80, 6204 (1958).

37. P. Hausen, H. Stein, Europ. J. Biochem. 4, 401 (1968).

38. Martin and Doty, Analyt. Chem. 21, 965 (1949)
Weil Macherbe, H. u. R.H. Green, Biochem. J. 49, 286 (1951).

39. A.M. Michelson, J. Chem. Soc. 3655 (1959).

40. Houben-Weyl, Org. Phosphorverbindungen, Thieme-Verlag Stuttgart, 1964, Teil 2, S. 276.

41. R. Dulbecco, M. Vogt, J. Exptl. Med. 99, 183 (1954).

42. A.K. Field, A.A. Tytell, P. Lampson, M.R. Hillemann, PNAS 58, 1004 (1967).

43. V.M. Ingram, A.O.W. Stretton, BBA 62, 456 (1962).

Lebenslauf

24.12.1939	geboren in Görlitz
1945 - 1953	Besuch der Grundschule in Görlitz
1953 - 1957	Besuch der Oberschule in Görlitz
20.5.1957	Reifeprüfung an obiger Schule
22.9.1957	Verlegung des Wohnsitzes in die Bundesrepublik
Nov. 1957 - März 1958	Lehrgang zur Anerkennung des in Görlitz erworbenen Reifezeugnisses am Felix-Klein-Gymnasium in Göttingen
18.3.1958	Anerkennungsprüfung
1.4.1958 - 31.3.1960	Praktikantenzeit in der Rats-Apotheke Lindau/Harz
2.3.1960	pharmazeutisches Vorexamen in Hildesheim
SS 1960/WS 1960/61	Pharmaziestudium an der Philosophisch-Theologischen Hochschule Bamberg
SS 1961/SS 1963	Fortsetzung des Studiums an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
24.10.1963	Pharmazeutische Prüfung in Würzburg
1964	Kandidatenjahr in der Adler-Apotheke Iserlohn
7.1.1965	Approbation als Apothekerin
1965/1966	Tätigkeit in der Löwen-Apotheke Hildesheim
Sept. 1966 - April 1969	Doktorarbeit unter Anleitung von Professor Dr. G. Schramm / Priv.-Doz. Dr. A. Anderer am Max-Planck-Institut für Virusforschung in Tübingen

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

A. Anderer
H. Auterhoff
J. Brandmüller
C.H. Brieskorn
Th. Dimmling
K. Gailer
L. Holleck
F. Lembeck
H. Meier
H. Metzner
W. Neumann
J. Riehl
G. Schramm
W. Simonis
P. Tunmann
O.H. Volk
G. Weitzel
H. Wildner
H. Zeidler.

BAMBERGER FOTODRUCK · RUDOLF RODENBUSCH
8600 BAMBERG · Markusplatz 22 · Tel.: 0951/62794